

Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana* - Kofaktoren, Lokalisation und Funktion *in planta*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tanja Göbel

geboren in Worms

Marburg an der Lahn, 2020

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von November 2011 bis Dezember 2014 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: 05.10.2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars Matthias Voll

Tag der Disputation: 19.10.2020

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Göbel T., Reisbacher S., Batschauer A., Pokorny R. (2017). Flavin Adenine Dinucleotide and N⁵,N¹⁰-Methenyltetrahydrofolate are the *in planta* cofactors of *Arabidopsis thaliana* cryptochrome 3. *Photochem. Photobiol.*, **93**, 355-362. (doi:10.1111/php.12622)

Weitere Publikation in Vorbereitung:

Kiontke S., Göbel T., Brych A., Batschauer A. (2020). DASH-type cryptochromes – solved and open questions. *Biol. Chem*

Summary

Cry3 from *Arabidopsis thaliana* is one of the first identified DASH type cryptochromes (Kleine *et al.*, 2003). However, the biological function of cry3 remained elusive and the question whether cry3 could act as a photoreceptor was unanswered. The majority of available data on cry3 were obtained with heterologously expressed cry3. The effective immunoprecipitation of *in planta* expressed cry3-GFP enabled the fluorimetric characterisation of the bound cofactors as FAD and MTHF, and confirmed the data of recombinant *E. coli* expressed cry3 (Pokorny *et al.*, 2005; Moldt *et al.*, 2009). Thus the *E. coli* expressed and HIS-tagged cry3 seems to be a valid surrogate of cry3 expressed *in planta*.

To get further insight into the biological function of cry3, its expression and localisation was examined. The relative transcript level of *CRY3* was transiently induced by all tested light qualities with a maximum two hours after the onset of light. The transcript level of *CRY3* was regulated by cry1, cry2, UVR8 and phyA. Even under red light phyA was the prominent regulator of cry3 expression.

Analysing the *cry3* deletion mutant revealed a slight but reproducible effect on inhibition of hypocotyl elongation during deetiolation of *Arabidopsis* seedlings. The *cry3* mutant seedlings showed a weaker response to blue light. Though a complementation of this phenotype failed, the chloroplast proteome was altered in a 2D DIGE analysis comparing the *cry3* deletion mutant with the wild type. This result was substantiated by Western blot analyses, even though the differences were only observed in chloroplast extracts but not in whole cell extracts. Thus, in summary the obtained results are in line with a function of cry3 as photoreceptor.

While cry3 localisation was believed to be restricted to chloroplast and mitochondria, this study showed that cry3-GFP is also present in the nucleus and especially enriched in the nucleolus. Thus, cry3 is present in all DNA containing cell compartments. This is of special interest due to the ability of cry3 to bind single stranded DNA and RNA, as shown in *in vitro* studies (Pokorny *et al.*, 2008). In chloroplasts, cry3 was found to be a soluble stroma protein and SEC data indicated an association with a large, soluble complex. However, the identification of cry3 interaction partners using CoIP and subsequent mass spectrometry of the eluates failed to detect a specific candidate. Whereas CoIPs were only used to search for

interacting chloroplast proteins, in lines expressing cry3-HA and cry3-GFP, a Y2H library screen was performed with a complete cDNA library including proteins of all cellular compartments. Two specific interaction partners were found: NUP205, a nuclear pore protein and DPE2, a cytosolic protein acting in starch metabolism. Further analyses have to verify the Y2H interactions and show the biological relevance of these findings if any.

Inhaltsverzeichnis

Summary	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Sonnenlicht ist für Pflanzen Energie- und Informationsquelle	1
1.2 Pflanzliche Photorezeptoren	1
1.2.1 Die Rot/Dunkelrot-Rezeptoren.....	2
1.2.2 Blaulichtphotorezeptoren	8
1.2.2.1 Pflanzliche Cryptochrome	9
1.2.2.2 Phototropine	14
1.2.2.3 Die Zeitlupefamilie	17
1.2.3 Der UV-B-Photorezeptor UVR8	18
1.3 Photolyasen und DASH-Cryptochrome	19
1.3.1 DASH Cryptochrome und Cry3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1.1.1 Biologische Funktion von DASH-Cryptochromen	23
1.4 Zielsetzung.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Geräte	27
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4 Größenmarker	29
2.1.5 Organismen	29
2.1.5.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien und Mutanten.....	29
2.1.5.2 <i>E.Coli</i>	30
2.1.5.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2.1.5.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.1.5.5 Phagen	31
2.1.6 Plasmide	31
2.1.7 Primer und Oligos	32
2.1.8 Antikörper.....	33
2.2 Allgemeine Methoden.....	35
2.2.1 Sterile Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.2.2 Arbeiten mit <i>Arabidopsis thaliana</i> Keimlingen.....	35

2.2.2.1 Anzucht für die Hypokotyllängenmessung.....	35
2.2.2.2 Anzucht zum Nachweis spezifischer Proteine während der Deetiolierung	36
2.2.3 Pflanzenanzucht auf Erde	36
2.2.4 Chlorophyllmengenbestimmung	37
2.2.5 Mikroskopie	37
2.2.6 Transiente Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkultur.....	37
2.2.6.1 Protoplastierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Blattmaterial und Keimlingen.....	38
2.2.6.2 Protoplastierung von Zellkultur.....	38
2.2.6.3 Reinigung und Bestimmung der Zellzahl	38
2.2.6.4 Transformation der Protoplasten.....	38
2.2.7 Arbeiten mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.2.7.1 Anzucht und Lagerung.....	40
2.2.7.2 Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien	40
2.2.7.3 Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien	41
2.2.7.4 Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	41
2.2.7.5 <i>Floral Dip</i>	42
2.3 Molekularbiologische Methoden	44
2.3.1 Klonierungsstrategien.....	44
2.3.1.1 CRY3:HA und CRY3:cMyc.....	44
2.3.1.2 cry3 in pGBKT7	44
2.3.2 DNA Extraktion aus Pflanzen	44
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.3.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.3.5 Genexpressionsanalyse mittels <i>real time</i> PCR.....	46
2.3.5.1 Pflanzenanzucht und Belichtung.....	46
2.3.5.2 RNA Extraktion und DNase Behandlung.....	47
2.3.5.3 Reverse Transkription und <i>real time</i> PCR.....	47
2.3.6 <i>Single nucleotid polymorphism</i> Detektion mit hochauflösenden Schmelzkurven	48
2.3.7 Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
2.3.7.1 Beschreibung der verwendeten Plasmide.....	50
2.3.7.2 Medien	51
2.3.7.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	51
2.3.7.4 Umwandlung der λ -Act cDNA <i>library</i> in eine Plasmid <i>library</i>	52
2.3.7.5 Yeast two hybrid library screen.....	53
2.3.7.6 Identifikation positiven Klone	54
2.3.7.7 Wiedergewinnung der Plasmide	56
2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	57
2.4.1 Proteinextraktionen.....	57
2.4.1.1 Proteingesamtextrakt aus Blattmaterial (TCA/Aceton)	57
2.4.1.2 TCA/Aceton Fällung von Proteinen	57

2.4.1.3 Phenolextraktion von Proteinen	58
2.4.1.4 Pflanzliche Proteingestamtextakte in SDS-Probenpuffer	59
2.4.1.5 Proteingestamtextrakt aus Hefe	59
2.4.1.6 Native Proteinextrakte aus Pflanzen	59
2.4.1.7 Native Proteinextrakte aus Keimlingen	60
2.4.1.8 Isolation von Chloroplastenproteinen	60
2.4.1.9 PEG-Fraktionierung	62
2.4.1.10 Isolation von Thylakoidmembran-Proteinen	63
2.4.2 Proteinmengenbestimmung	63
2.4.2.1 Amidoschwarz	63
2.4.2.2 Bradford-Assay	64
2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	65
2.4.3.1 SDS-PAGE nach Lämmli	65
2.4.3.2 Phos-tag™ SDS PAGE	66
2.4.4 Visualisierung von Proteinen	67
2.4.4.1 Coomassie Brilliant Blau R250	69
2.4.4.2 Kolloidale Coomassie Färbung	70
2.4.4.3 Silberfärbung	70
2.4.4.4 Deep purple™	71
2.4.4.5 CyDye DIGE Fluors	72
2.4.5 2D-Gelelektrophorese	72
2.4.5.1 Probenvorbereitung und Markierung	73
2.4.5.2 Isoelektrische Fokussierung	74
2.4.5.3 Äquilibration und SDS-PAGE	74
2.4.6 Western blot	76
2.4.6.1 Transfer	76
2.4.6.2 Transfer von Phos-tag™ SDS Polyacrylamid-Gelen	77
2.4.6.3 Immunodetektion mit LI-COR Odyssey®	77
2.4.6.4 Immunodetektion mit ECL	78
2.4.6.5 Strippen der Membran	79
2.4.7 Size Exclusion Chromatography	80
2.4.8 Kofaktoren von cry3-GFP	82
2.4.8.1 Immunopräzipitation von cry3-GFP	82
2.4.8.2 Fluoreszenzspektroskopie	83
2.4.8.3 Reversed phase HPLC	84
2.4.9 Co-Immunopräzipitation	84
2.4.9.1 Extrakte für die CoIP	85
2.4.9.2 Anti-HA CoIP	86
2.4.9.3 Anti-GFP CoIP	88
2.4.9.4 Elution	89
2.4.9.5 Nukleinsäuren-Bindung von cry3-GFP	90
2.4.10 Massenspektrometrische Proteinidentifikation	90

2.4.10.1 Maldi TOF MS bzw. MS/MS	91
2.4.10.2 LC-ESI-MS/MS	93
3 Ergebnisse.....	95
3.1 Charakterisierung der Kofaktoren von <i>in planta</i> exprimiertem cry3.....	95
3.1.1 Über Fusion mit GFP kann cry3 aus Pflanzenextrakten angereichert werden.....	95
3.1.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen deuten auf die Bindung eines Folats und Flavins an cry3-GFP hin	96
3.1.3 Das HPLC-Elutionsprofil spricht für die Bindung von MTHF und FAD an pflanzenexprimiertes cry3.....	99
3.2 Expression und Lokalisation von cry3 in Pflanzenzellen	102
3.2.1 Expression von cry3-HA in transgenen <i>Arabidopsis</i> -Linien	102
3.2.2 Die cry3-HA Proteinmenge ist während der Deetiolierung von Keimlingen weitestgehend stabil	104
3.2.3 Affinitätsmarkiertes cry3 findet sich als lösliches Protein in den Chloroplasten	105
3.2.4 Die <i>size exclusion chromatography</i> deutet auf das Vorkommen von cry3 in einem hochmolekularen Komplex hin	107
3.2.5 YFP markiertes cry3 ist im Zellkern und in Chloroplasten von Pflanzenzellen zu finden	111
3.3 Phänotypen der cry3 Mutante	114
3.3.1 Die <i>cry3</i> Mutante zeigt ein verändertes Verhalten während der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums	114
3.3.2 Einfluss von cry3 auf das Chloroplastenproteom.....	116
3.3.2.1 Das Fehlen von cry3 beeinflusst die Menge einiger Chloroplastenproteine	116
3.3.2.2 Die Ergebnisse der 2D-DIGE können durch quantitative <i>Western blots</i> reproduziert werden.....	120
3.3.2.3 Die Mengen von RA und Pap1 unterscheiden sich in Gesamtextrakten der <i>cry3</i> - Mutante nicht deutlich vom WT.....	122
3.3.2.4 Der Einfluss von cry3 auf die Menge spezifischer Chloroplastenproteine wird durch die Expression von cry3-HA in der <i>cry3</i> Mutante nicht komplementiert.....	124
3.4 Interaktionspartner von cry3	126
3.4.1 Co-Immunopräzipitation	126
3.4.1.1 Cry3-HA und cry3-GFP können durch eine Änderung des pH-Werts nicht effektiv eluiert werden	126
3.4.1.2 In den Eluaten der CoIPs sind die affinitätsmarkierten Varianten von cry3 massenspektrometrisch nachweisbar	128
3.4.1.3 Über LC-ESI-MS konnte kein potentieller Interaktionspartner eindeutig identifiziert werden	131
3.4.2 <i>Yeast two hybrid library screen</i> zur Identifikation von cry3 Interaktionspartnern	132
3.4.2.1 Die Expression des BD-cry3 Fusionsproteins beeinflusst das Wachstum der Hefezellen nicht	133
3.4.2.2 Im Y2H <i>library screen</i> wurden zwei potentielle Interaktionspartner von cry3 identifiziert.....	134

4 Diskussion	138
4.1 Die <i>in planta</i> Cofaktoren von cry3.....	138
4.1.1 Die an pflanzenexprimiertem cry3-GFP gebundenen Cofaktoren können fluorimetrisch charakterisiert werden	138
4.1.2 MethylenTHF scheint <i>in planta</i> nicht von cry3 gebunden zu werden.....	140
4.1.3 MethenylTHF und FAD sind die <i>in planta</i> Cofaktoren von cry3	141
4.2 Lokalisation und Expression von cry3	144
4.2.1 Es gibt Hinweise auf die Interaktion von cry3 mit einem großen, löslichen Proteinkomplex oder Nukleinsäuren innerhalb der Chloroplasten	145
4.2.2 Cry3-Fusionsproteine sind in allen DNA enthaltenden Zellkompartimenten zu finden	148
4.2.3 Im Licht wird die Expression von cry3 schnell und durch mehrere Photorezeptoren induziert	150
4.3 Phänotypen der cry3-Mutante.....	155
4.3.1 Die cry3-Mutante reagiert während der Deetioloierung von Keimlingen schwächer auf Blaulicht.....	155
4.3.2 Die cry3 Mutante zeigt ein verändertes Chloroplastenproteom	157
4.4 Interaktionspartner von cry3	162
4.4.1 Mittels CoIP kann kein eindeutiger Interaktionspartner von cry3-HA und cry3-GFP in Chloroplastenextrakten identifiziert werden.....	162
4.4.2 Im <i>yeast two hybrid library screen</i> interagiert cry3 spezifisch mit zwei Proteinen.....	165
4.4.2.1 Über eine Interaktion mit DPE2 könnte cry3 den Zuckerstoffwechsel der Pflanze modulieren.....	167
4.4.2.2 NUP205 ist Teil des <i>nuclear pore complex</i> und potenzieller Interaktionspartner von cry3	169
5 Zusammenfassung.....	171
6 Anhang	173
6.1 Abbildungen	173
6.2 Tabellen	184
6.3 Quellen	185
7 Verzeichnisse	200
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	200
7.2 Tabellenverzeichnis	201
Danksagungen	202
Lebenslauf	203
Erklärung	204

Abkürzungsverzeichnis

2D DIGE	2-dimensionale Differenz Gelelektrophorese	g	Gramm
µg	Mikrogramm	GAF	cGMP phosphodiesterase/adenyl cyclase/FhIA
µl	Mikroliter	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
µmol	Mikromol	GLN1	Glutaminsynthetase cytosolic
A	Alanin	GLN2	Glutaminsynthetase plastidär/mitochondrial
AD	Gal4 Aktivierungsdomäne	GTP	Guanosintriphosphat
APS	Ammonium Persulfat	H	Histidin
At-cry3	Wildtyp cry3 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	h	Stunden
ATP	Adenosintriphosphat	H₂O_{dest.}	bidestilliertes Wasser (Milli-Q)
BD	Gal4 DNA-Binde-Domäne	HBI	4-(p-hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-one
BIC	<i>Blue-light Inhibitor of Cryptochromes</i>	HFR1	<i>LONG HYPOCOTHYL IN FAR-RED1</i>
BSA	Bovinseraalbumin	HIR	<i>high irradiance responses</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	HKIN	<i>histidine kinase related</i> -Domäne
CAB	Chlorophyll a/b bindende Proteine	HPLC	<i>high pressure liquid chromatographie</i>
CCT	<i>cryptochrome C-terminus</i>	HRM	<i>high resolution melting curve</i>
CES	<i>control by epistasy of synthesis</i>	HRP	Peroxydase aus Meerrettich
Chl	Chlorophyll	IEF	isoelektrische Fokussierung
Clp	Chloroplasten	IPG	immobilisierte pH-Gradienten
CO	<i>CONSTANS</i>	kDa	Kilodalton
COL3	<i>CONSTANS-LIKE3</i>	L	Leucin
CoIP	<i>Co-Immunoprecipitation</i>	Ler	<i>Landsberg erecta</i>
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1	LFR	<i>low fluence responses</i>
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin Dimere	Lhcb	Chlorophyll a/b bindende Proteine des LHCII
cpDNA	Chloroplasten-DNA	LHC	<i>Light harvesting complex</i>
cpSRP	<i>Signal recognition particles</i>	LHCP	Proteine der Lichtsammelkomplexe
CRY	Wildtyp Cryptochromgen	lincRNA	<i>long intergenic non-coding</i> RNAs
cry	Mutanten Cryptochromgen	MALDI-TOF	Matrix unterstützte Desorption/Ionisation Flugzeitanalyse
cry	Cryptochrom Holoprotein	MethenylTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolate
CRY	Cryptochrom Apoprotein	MethylenlTHF	5,10-Methylen tetrahydrofolate
cTP	Chloroplasten-Transitpeptid	mg	Milligramm
DASH	<i>Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis und Homo</i>	min	Minuten
DIGE-Farbstoffe	<i>Amersham CyDye DIGES Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE</i>	mRNA	messenger RNA
DMF	Dimethylformamid	M	Molar (Mol/l)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MS	Murashige & Skoog
DR	dunkelrotes Licht	MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolate
DTT	Dithiothreitol	MV	Methylviologen
ECL	<i>enhanced chemilumescence</i>	NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ng	Nanogramm
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure	NPC	<i>nuclear pore complex</i>
EtOH	Ethanol	NTE	N-terminale Extension
FAD	Falvinadenindinucleotid	OEC	<i>Oxygen-evolving enhancer</i>
FHL	<i>fhv1-like</i>		Proteine
FHY	<i>far-red elongated hypocotyl1</i>	PAP	Plastid-Lipid assoziierten Proteine

Abkürzungen

PAS	Per/Arndt/Sim	SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
PEG	Polyethylenglycol	SPA1	<i>Supressor of Phytochrome A</i>
PFMF	<i>peptide-fragment-mass-fingerprint</i>	SSP	<i>Stromal processing Protease</i>
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1	STO	<i>SALT TOLERANCE RELATED</i>
PHR	<i>photolyase homology region</i>	Tat	<i>Twin-Arginine-Translokase</i>
phy	Phytochrom	Temed	<i>N,N,N',N',-Tetramethylendiamin</i>
pl	isoelektrischer Punkt	Tic	<i>translocon at the inner membrane of chloroplasts</i>
PIF	<i>phytochrome interacting factors</i>	Toc	<i>translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts</i>
PMF	<i>peptide-mass-fingerprint</i>	TPP	<i>thylakoid processing peptidase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TRX	Thioredoxin
PPK	<i>Photoregulatory Protein Kinase</i>	UE	Untereinheit
PRK	Phosphoribulokinase	V-hr	Voltstunden
PSII	Photosystem II	VLFR	<i>very low fluence responses</i>
PSOB1/2	<i>oxygen evolving enhancer complex</i> des Photosystems II	VP	Valin-Prolin
PVPP	Polyvinylpyrrolidone	W	Tryptophan
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone	xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
R	Rotlicht	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
RA1	Rubisco Activase Spliceform1		
RA2	Rubisco Activase spliceform2		
RNA	Ribonukleinsäure		
ROS	reaktive Sauerstoffspezies		
RT	Raumtemperatur		
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat- carboxylase/-oxygenase		
s	Sekunden		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>		

1 Einleitung

1.1 Sonnenlicht ist für Pflanzen Energie- und Informationsquelle

Sonnenlicht ist die wichtigste Energiequelle für nahezu alles Leben auf der Erde. Photosynthetische Organismen wandeln die Lichtenergie in organische Stoffe um, die dem Großteil der Ökosysteme auf diesem Planeten als direkte oder indirekte Nahrungsquelle dienen. Neben einigen Bakterien betreiben vor allem Pflanzen Photosynthese. Für Pflanzen als sessile Lebewesen ist es dabei entscheidend, sich optimal an die gegebenen Bedingungen anpassen zu können einerseits, um das Licht optimal nutzen zu können und andererseits, um sich vor den schädlichen Einflüssen der ultravioletten Strahlung zu schützen. So hat sich in Pflanzen ein kompliziertes Netzwerk von Photorezeptoren und nachgeschalteten Komponenten entwickelt, die die unterschiedlichen Spektralfarben wahrnehmen und wichtige Entwicklungs- und Anpassungsschritte steuern, zusammengefasst als Photomorphogenese bezeichnet.

Wie wichtig Licht für Pflanzen als Informationsquelle ist, spiegelt sich darin wieder, dass in *Arabidopsis thaliana* rund 30 % aller Gene lichtreguliert sind (Ma *et al.*, 2001; Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Über die verschiedenen Photorezeptoren nehmen Pflanzen zunächst Informationen über Intensität, Richtung, Dauer und Qualität des Lichtes wahr. Allen Photorezeptoren gemein ist dabei ein sogenannter Chromophor, also der Teil des Photorezeptors, mit dem Licht absorbiert werden kann. Je nach Art des Rezeptors kann dies ein gebundener Kofaktor oder aber das Protein selbst sein. Das perzipierte Licht führt zu einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins, gefolgt von einer Weiterleitung des Signals und schlussendlich einer physiologischen Antwort. Unter natürlichen Lichtbedingungen wird in der Regel nicht nur eine Klasse von Photorezeptoren angeregt, sondern mehrere, die zum Teil die gleiche physiologische Antwort modulieren. Die Signaltransduktionskaskaden können daher mitunter sehr komplex sein und sind bis heute nicht in jedem Detail verstanden (Tripathi *et al.*, 2019; Xu, 2019; Wang *et al.*, 2018a; Wang *et al.*, 2018b; Wang und Lin, 2019).

1.2 Pflanzliche Photorezeptoren

Pflanzen verfügen über Photorezeptoren für UV-B-, UV-A-Strahlung sowie blaues, rotes und dunkelrotes Licht. Ob es einen speziellen Rezeptor für Grünlicht gibt oder ob die Wahrnehmung dieser Spektralfarbe über einen der bekannten Photorezeptoren stattfindet, ist hingegen noch Gegenstand aktueller Forschung. Grünlicht zeigt besonders unter schwachen Lichtbedingungen einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung von Pflanzen. Zumindest zum Teil scheint dieser Effekt jedoch durch Blaulichtrezeptoren vermittelt zu sein. (Folta und Maruhnich, 2007; Efimova *et al.*,

2013; Wang und Folta, 2013). Klar ist, dass Pflanzen auf den gesamten Spektralbereich des sichtbaren Lichts und des nahen UV-Bereichs reagieren. Die ausgelösten physiologischen Antworten erstrecken sich dabei von der Keiminduktion, über Blattbewegungen bis hin zur Blühinduktion.

1.2.1 Die Rot/Dunkelrot-Rezeptoren

Die ersten Photorezeptoren, die in Pflanzen charakterisiert werden konnten, waren Rot/Dunkelrot-Rezeptoren: die Phytochrome. Schon 1952 konnte gezeigt werden, dass die Keimung von Salatsamen durch einen Rotlichtpuls (etwa 660 nm) induziert werden kann. Dieser Effekt ist wiederum durch die anschließende Gabe eines Dunkelrotpulses (etwa 730 nm) revertierbar. Bei mehreren aufeinander folgenden Pulsen ist entscheidend, ob zuletzt rotes oder dunkelrotes Licht gegeben wurde (Borthwick *et al.*, 1952). Durch die Isolierung der ersten Phytochrome konnte gezeigt werden, dass dieses Phänomen durch ein Protein vermittelt wird, dessen aktive Form durch Bestrahlung mit Dunkelrot in die inaktive Form überführt wird.

Die aktive Form des Phytochroms wird entsprechend seines Absorptionsmaximums im dunkelroten (*far red*) Bereich Pfr-Form genannt und die inaktive Form mit einem Absorptionsmaximum im roten Spektralbereich als Pr-Form bezeichnet. Da sich die Absorptionsspektren der photoreversiblen Proteine überlappen, besteht stets ein Gleichgewicht zwischen der aktiven und inaktiven Form, auch als Photoequilibrium bezeichnet (Vierstra und Quail, 1983). Beide Formen sind ebenfalls in der Lage, blaues Licht zu absorbieren, doch wird dadurch nur wenig Phytochrom in die Pfr-Form überführt. Für Phytochrom A (phyA) konnten aber in *Arabidopsis thaliana* auch spezifische Blaulichtantworten gefunden werden (Chun *et al.*, 2001).

In *Arabidopsis thaliana* sind insgesamt fünf unterschiedliche Phytochrome vorhanden: phy A bis E (Sharrock und Quail, 1989). Obwohl PHYA die höchste Verwandtschaft zu PHYC zeigt, hat phyA doch deutlich andere und einzigartige Eigenschaften (Franklin und Quail, 2010). Die Pfr-Form von phyA wird im Licht schnell abgebaut, weshalb man auch von einem lichtlabilen Phytochrom spricht. Die Phytochrome B bis E sind hingegen weitestgehend lichtstabil (Sharrock und Quail, 1989). Während in etiolierten Keimlingen phyA mengenmäßig dominiert, führt die Belichtung zu einer Ubiquitinierung und dem schnellen Abbau des Photorezeptors über das 26s-Proteasom (Clough und Vierstra, 1997). Die Ubiquitinierung der phyA Pfr wird über die Interaktion mit der E3-Ubiquitin-Ligase, *Constitutive Photomorphogenic1* (COP1) und *Supressor of PhyA1* (SPA1) vermittelt. Der Grad der Phosphorylierung von phyA hat dabei einen Einfluss auf die Interaktion mit dem COP1/SPA1-Komplex (Saijo *et al.*, 2008). Der Abbau des lichtlabilen Phytochroms scheint somit ein sehr genau kontrollierter Prozess zu sein. Der Abbau der Pfr-Form in Verbindung mit dem Kernimport, der für die Signaltransduktion entscheidend ist (siehe unten), führt interessanterweise dazu, dass phyA als einziges Phytochrom als Dunkelrotrezeptor fungieren kann (siehe auch Casal *et al.*, 2014).

Tatsächlich zeigt phyA aber auch unter starkem Rotlicht (über $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) einen signifikanten Einfluss auf die Deetiolierung von Keimlingen (Franklin und Whitelam, 2007). Außerdem haben Microarray-Untersuchungen von verschiedenen Phytochrom-Mutanten gezeigt, dass während des Übergangs von Dunkel zu Rotlicht die Expression der so genannten *early response genes* hauptsächlich durch phyA induziert wird. Somit scheint phyA in der Frühphase der Deetiolierung der dominante Photorezeptor unter kontinuierlichem Rotlicht zu sein (Tepperman *et al.*, 2006).

Phytochrome vermitteln darüber hinaus eine Vielzahl von Antworten, die sich über den gesamten Lebenszyklus der Pflanzen erstrecken. So können beispielsweise, neben der Deetiolierung von Keimlingen, der Blühzeitpunkt und vor allem auch Schattenvermeidungsreaktionen durch unterschiedliche Anteile von rotem oder dunkelrotem Licht reguliert werden. Doch nicht nur die Lichtqualität ist für Phytochromantworten wichtig, auch die Fluenzrate ist entscheidend. So wird zwischen *very low fluence responses* (VLFR), *low fluence responses* (LFR) und *high irradiance responses* (HIR) unterschieden (Casal *et al.*, 1998).

Zu den VLFR gehört in *Arabidopsis thaliana* die Keiminduktion. Um eine solche Antwort auszulösen, reichen bereits $0,5$ bis $10 \mu\text{mol m}^{-2}$ dunkelrotes Licht bzw. 10^{-4} bis $10^{-2} \mu\text{mol m}^{-2}$ rotes Licht oder allgemein sehr schwaches Licht im Bereich von 300 bis 780 nm (Casal *et al.*, 1998; Shinomura *et al.*, 1996). Dabei ist es egal, ob diese geringe Lichtmenge durch sehr schwaches kontinuierliches Licht oder einen kurzen Lichtpuls erreicht wird. Dieser Zusammenhang wird auch als Reziprozität bezeichnet (Casal *et al.*, 1998). VLFR sind nicht durch dunkelrotes Licht revertierbar. Dies liegt daran, dass bereits eine Konvertierung von unter 0,1 % des gesamten Phytochroms in die Pfr-Form genügt, um eine Antwort auszulösen (Botto *et al.*, 1996). Wie bereits erwähnt überlappen die Absorptionsspektren von Pr und Pfr. Bei der Belichtung mit dunkelrotem Licht wird immer noch genug Phytochrom in die Pfr Form überführt um den VLFR auszulösen. In *Arabidopsis thaliana* wird der VLFR vor allem durch das lichtlabile phyA vermittelt. Die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts spielt dabei eine untergeordnete Rolle (Casal *et al.*, 2014).

Durch dunkelrotes Licht (DR) revertierbar ist der LFR, auch für ihn gilt die Reziprozität. Der LFR kann mit 1 bis $1000 \mu\text{mol m}^{-2}$ Rotlicht als Puls oder Dauerlicht ausgelöst werden, was 3 bis 85% des Phytochroms in die Pfr-Form versetzt (Botto *et al.*, 1996; Kendrick und Cone, 1985). Der LFR kann folglich durch DR revertiert werden, da die Menge an Pfr dadurch deutlich reduziert wird und unter den Schwellenwert sinkt (Casal *et al.*, 2014). Den dominantesten Einfluss auf den LFR hat phyB, aber auch phyC, phyD und phyE spielen in *Arabidopsis* hier eine Rolle.

Die Rotlicht-HIR (R-HIR) wird hingegen hauptsächlich durch phyB vermittelt und die Dunkelrot-HIR (DR-HIR) durch phyA. HIRs sind nicht reziprok und können nur durch eine nicht zu schwache

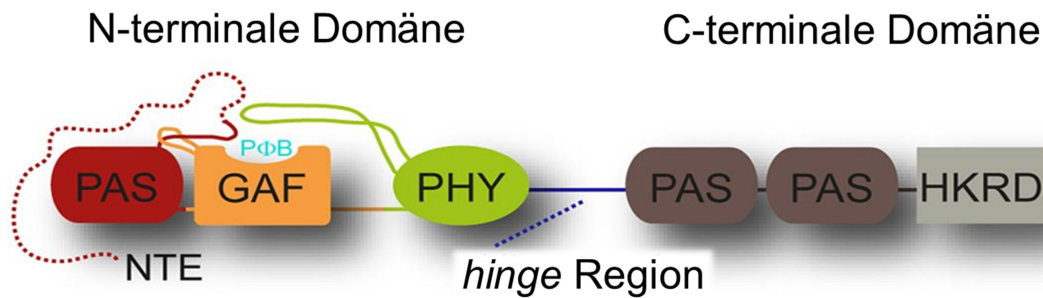


Abbildung 1.1. Domänenstruktur von pflanzlichen Phytochromen.

Die N-terminale Domäne setzt sich aus einer N-terminalen-Extension (NTE, in blau dargestellt), einer PAS, einer GAF-Domäne in der der Chromophor Phytochromobilin (PΦB) gebunden ist und der *phytochrom specific* (PHY)-Domäne zusammen. Eine *hinge* Region bildet die Verbindung zur C-terminalen Domäne, diese wird von zwei PAS und der *histidine kinase related* (HKRD)-Domäne gebildet. Zwei Loop Strukturen sind dargestellt: das *light sensing knot lasso* Motiv in der GAF Domäne (in orange) und das *hairpin* Motiv in der PHY-Domäne (in grün). Verändert nach von Horsten *et al.*, 2016.

Dauerbelichtung ausgelöst werden, weshalb sie auch nicht photoreversibel sind (Casal *et al.*, 1998). Die Mechanismen, über die phyA auf sehr schwaches und starkes Licht reagiert, sind unterschiedlich. Während für den VLFR sehr geringe Mengen phyA in Pfr-Form zu genügen scheinen, ist bei der HIR eher der Wechsel zwischen der aktiven und inaktiven Form für die Signalweiterleitung entscheidend (Rausenberger *et al.*, 2011). Für den VLFR von phyA scheint dabei die Anwesenheit der N-terminalen Domäne im Zellkern ausreichend zu sein. Ein Fusionsprotein aus der N-terminalen Domäne von phyA, β -Glucuronidase, GFP und einer *nuclear localisation sequence* (NLS) reichte aus um einen VLFR zu vermitteln nicht aber einen HIR (Mateos *et al.*, 2006). Für die HIR ist hingegen auch der C-terminale Teil der Phytochrome erforderlich. Dies spricht für deutlich unterschiedliche Arten der Signaltransduktion bei diesen Antworttyp und kann somit erklären, wieso verschiedene physiologische Antworten zwar von dem gleichen Photorezeptor vermittelt aber unter verschiedenen Lichtbedingungen ausgelöst werden (Casal *et al.*, 2014).

Die Absorptionseigenschaften der Phytochrome werden durch den gebundenen Chromophor bestimmt. In höheren Pflanzen ist dieser Chromophor das Phytochromobilin, das über einen Thioether kovalent an den etwa 120 kDa großen Proteinteil gebunden ist. Phytochromobilin ist ein lineares Tetrapyrrol, welches wie Chlorophyll im Plastiden aus Häm gebildet wird. Der Chromophor wird aus dem Plastiden ins Cytoplasma exportiert und dort an das Phytochrom-Apoprotein gebunden. Hierbei entsteht die Pr-Form (Lagarias und Rapoport, 1980). Der N-terminale Teil des Phytochroms wird auch als photosensorische Einheit bezeichnet. Hier ist das Tetrapyrrol an ein konserviertes Cystein in einer *cGMP-phosphodiesterase/adenyl-cyclase/FhlA* (GAF)-Domäne gebunden (Burgie *et al.*, 2014). Dieser Teil des Proteins enthält in Pflanzen außerdem eine Per/Arndt/Sim (PAS) und eine *phytochrom specific* (PHY)-Domäne, sowie eine N-terminale Extension (NTE) (siehe Abbildung 1.1). Die NTE scheint die Dunkelreversion des Chromophors zu

unterdrücken und ist daher für die Stabilität der Pfr-Form wichtig (Vierstra, 1993; Rockwell *et al.*, 2006). Die in Abbildung 1.1 dargestellten *loop*-Strukturen scheinen dabei für die biologische Funktion der Phytochrome essentiell und während der Photokonversion von Bedeutung zu sein. Das *light sensing knot lasso*-Motiv in der GAF-Domäne scheint zu einer stabilen Interaktion der PAS- und GAF-Strukturen während der Photokonversion von Pr zu Pfr zu führen und außerdem als Bindemotiv für PIFs zu fungieren. Die *hairpin*-Struktur in der PHY-Domäne könnte dabei die Assoziation mit der C-terminalen Hälfte des Phytochromes vermitteln (Hoang *et al.*, 2019; Kikis *et al.*, 2009).

Die C-terminale Hälfte weist zwei weitere PAS-Domänen und eine *histidine kinase related*-Domäne (HKIN) auf, die allerdings keine Histidinkinase-Aktivität mehr besitzt (Rockwell *et al.*, 2006). Pflanzliche Phytochrome liegen stets als Dimere vor. Während phyA nur als Homodimer gefunden

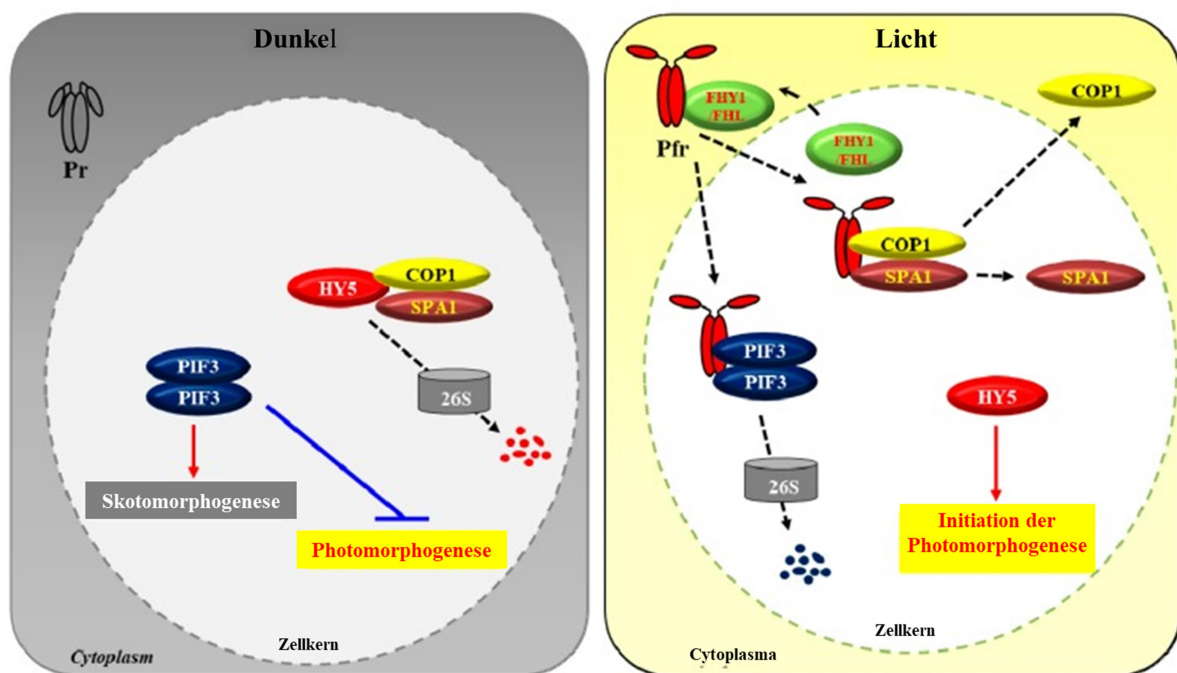


Abbildung 1.2 vereinfachtes Schema der Phytochrom-vermittelten Photomorphogenese.

Zur Vereinfachung ist PIF3 als Repräsentant der PIFs und HY5 als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Photomorphogenese, sowie SPA1 als Vertreter der SPA-Proteine gezeigt. Im Dunkeln befinden sich die Phytochrome in ihrer Pr-Form im Cytoplasma. Die PIF3-Proteine akkumulieren im Zellkern, dort induzieren sie die Skotomorphogenese (roter Pfeil) und hemmen die Photomorphogenese (blaue T-Linie) indem sie die Expression von entsprechenden Zielgenen regulieren. Der COP1-SPA1-Komplex führt zur Ubiquitinierung von HY5 und initiiert damit den proteosomalen Abbau über das 26S-Proteasom (gestrichelter, schwarzer Pfeil). HY5 liegt im Dunkeln weitestgehend in der phosphorylierten Form vor, die nur eine geringe Affinität zu den Promotoren der Zielgene aufweist und Substrat für die Ubiquitinierung ist (Waters und Langdale, 2009). Wenn durch die Absorption von Licht die aktive Pfr-Form gebildet wird, werden die Phytochrome in den Kern importiert (im Falle von phyA wird der Import durch FHV1 und FHL vermittelt), wo eine Interaktion mit den nachgeschalteten Signalkomponenten stattfindet. Die Phytochrome interagieren mit PIF3 und initiieren damit dessen Phosphorylierung und Ubiquitinierung, was schließlich zu einem schnellen, proteosomalen Abbau von PIF3 führt. Der COP1-SPA1-Komplex dissoziiert und COP1 wird aus dem Kern exportiert. HY5 akkumuliert und wird dephosphoryliert, was dessen Affinität zu COP1 weiter reduziert. HY5 kann nun die Transkription der Zielgene aktivieren. Es kommt zur Transkription der lichtgesteuerten Gene und der Photomorphogenese der Pflanze. Modifiziert nach (Hoang *et al.*, 2019)

wurde, bilden die anderen Phytochrome auch Heterodimere. Die Dimerisierung wird dabei über die PAS-Domänen der C-terminalen Hälfte des Proteins vermittelt und ist lichtunabhängig. In vielen Phytochromen konnte eine NLS innerhalb dieser PAS-Domänen identifiziert werden, welche wiederum für die Signalweiterleitung essenziell ist (Chen *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den anderen Phytochromen in *Arabidopsis* konnte für phyA keine NLS gefunden werden, der Photorezeptor ist somit auf Partner für den Kernimport angewiesen.

Die Absorption von Licht löst eine Rotation innerhalb des Chromophors aus, die zu einer Konformationsänderung des Proteins führt (Ulijasz und Vierstra, 2011, Vierstra und Zhang, 2011). Im Zusammenspiel mit mehreren der oben genauer beschriebenen Domänen des N-terminalen Teils ist es dabei möglich, die Pr- bzw. Pfr-Form zu stabilisieren. Dieser Vorgang kann als eine Art Umklappen (*toggle*) des Proteins verstanden werden (Burgie *et al.*, 2014). Die Konformationsänderung initiiert den Import in den Zellkern. Bei PhyB-E wird angenommen, dass durch die Konformationsänderung die NLS zugänglich wird (Chen *et al.*, 2005). PhyA trägt wie erwähnt keine NLS; hier findet der Import in den Zellkern durch eine Interaktion mit den Proteinen *far-red elongated hypocotyl1* (FHY1) und *fhv1-like* (FHL) statt (Hiltbrunner *et al.*, 2005, Hiltbrunner *et al.*, 2006). Im Zellkern werden FHY1 und FHL phosphoryliert und phyA aus dem Komplex entlassen (Hoang *et al.*, 2019). Auch wenn in lichtstabilen Phytochromen NLSs gefunden wurden, scheinen diese zumindest nicht allein den Import in den Zellkern zu vermitteln. Die Interaktion mit NLS-tragenden Proteinen scheint auch hier ein wichtiger Teil des Kernimports zu sein, für PhyB kommt dabei eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, den *phytochrome interacting factors* (PIFs), in Frage. Auch wenn die genauen Mechanismen des Imports der lichtstabilen Phytochrome unklar sind, läuft der Import nicht über FHY1 und FHL und stellt somit einen wichtigen Unterschied zwischen den Phytochromklassen dar (Legris *et al.*, 2019).

Im Zellkern angekommen, interagieren Phytochrome mit Transkriptionsfaktoren der *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Familie, den PIFs (siehe Abbildung 1.2). PIFs unterdrücken im Dunkeln die Photomorphogenese, indem sie an die G-Box-Sequenz von Schlüsselgenen binden und deren Transkription hemmen (Casal *et al.*, 2014). Im Licht führt die Interaktion der PIFs mit den Phytochromen zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau der PIFs (Franklin und Quail, 2010). Wichtige Transkriptionsfaktoren von lichtaktivierten Genen wie HY5 können nun an die frei gewordenen G-Box-Sequenzen binden und die Transkription initiieren. Gleichzeitig wirken PIFs auch als positive Transkriptionsaktivatoren für wichtige Gene der Skotomorphogenese, die Expression dieser Gene wird folglich durch den Phytochrom-initiierten Abbau im Licht reprimiert (Leivar und Monte, 2014). Auch die Menge von positiven Transkriptionsfaktoren der Photomorphogenese wie HY5 ist lichtreguliert. So wird HY5 im Dunkeln über eine E3-Ubiquitinligase abgebaut, vermittelt wird dies durch den COP1-SPA1-Komplex, worauf auch im folgenden Abschnitt

zu Blaulichtphotorezeptoren detaillierter eingegangen wird. Die Phytochrome interagieren in ihrer aktiven Pr-Form mit dem COP1-SPA1-Komplex und bedingen dessen Dissoziation, gefolgt von einer Translokation von COP1 in das Cytoplasma (Hoang *et al.*, 2019).

Für phyA aus *Arabidopsis thaliana* konnte zusätzlich eine Interaktion mit spezifischen Promotorbereichen gezeigt werden. Die DNA Bindung findet dabei indirekt über die Assoziation an DNA bindende Proteine statt (Chen *et al.*, 2014). Auch wird angenommen, dass Phytochrome im Cytoplasma als Photorezeptoren fungieren können. So interagieren beispielsweise phyA und Phototropin an der Plasmamembran und Mutantenstudien deuten darauf hin, dass cytoplasmatisches phyA einen Einfluss auf den Gravitropismus und Phototropismus hat (Jaedicke *et al.*, 2012; Rösler, Klein und Zeidler, 2007).

1.2.2 Blaulichtphotorezeptoren

Nicht nur für die Wahrnehmung von rotem und dunkelrotem Licht haben Pflanzen spezielle Photorezeptoren entwickelt. Auch zur Perzeption von UV-A-Strahlung und Blaulicht sind spezialisierte Rezeptoren bekannt. Neben den pflanzlichen Cryptochromen gehören dazu die Phototropine und Mitglieder der Zeitlupefamilie. Die Absorptionseigenschaften im Blaulicht kommen bei diesen Photorezeptoren durch ein gebundenes Flavin zustande, welches als Chromophor dient. Die Art der Bindung des Chromophors und auch die Antworten, die diese Proteine vermitteln sind recht unterschiedlich.

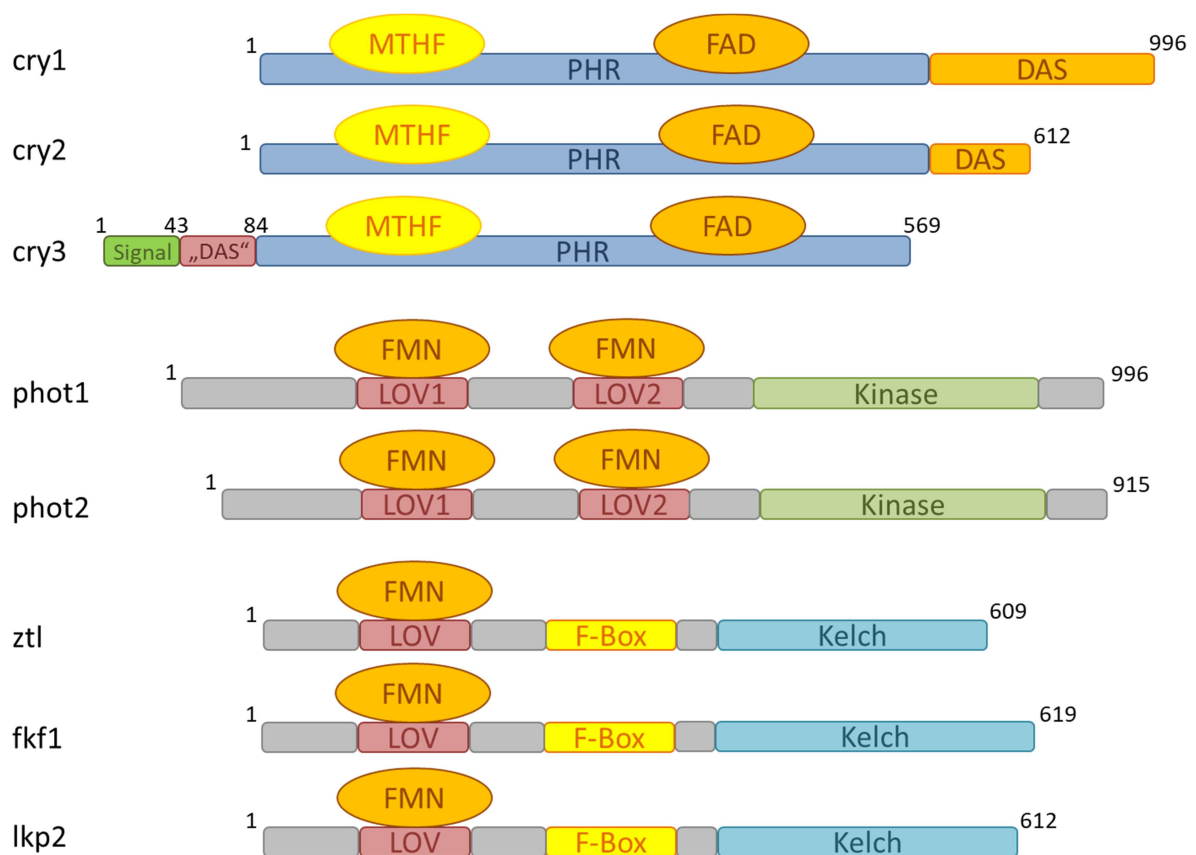


Abbildung 1.3 Domänenstruktur der Blaulichtrezeptoren aus *Arabidopsis thaliana*.

Die Cryptochrome cry1 bis cry3 weisen alle eine *photolyase related* (PHR)-Domäne auf, in der die Kofaktoren FAD und MTHF gebunden sind. Die pflanzlichen Cryptochrome cry1 und cry2 tragen eine C-terminale Extension (orange), in der sich das DAS-Motiv befindet (siehe Text). Das DASH-Cryptochrom trägt ein ähnliches Motiv („DAS“) am N-Terminus, gleich hinter dem Signalpeptid, welches den Import in die Organellen vermittelt. Die Phototropine phot1 und phot2 binden FMN in den beiden *light oxygen voltage* (LOV)-Domänen LOV1 und LOV2. Für die Signaltransduktion und Autophosphorylierung der Phototropine ist deren Kinase-Domäne im C-Terminus entscheidend. Die Rezeptoren der Zeitlupefamilie (ztl, fkf1 und lkp2) besitzen nur eine LOV-Domäne, an die der Chromophor FMN gebunden ist, sowie eine F-Box und Kelch-Wiederholungs-Domänen, die im Kontext der Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau von Zielproteinen entscheidend sind.

1.2.2.1 Pflanzliche Cryptochrome

Cryptochrome sind nah mit den DNA-Photolyasen (Proteine die spezielle, UV-induzierte DNA-Schäden erkennen und lichtabhängig reparieren können) verwandt. Neben den beiden klassischen, pflanzlichen Cryptochromen 1 und 2 (*cry1* und *cry2*) ist in *Arabidopsis thaliana* auch ein *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und *Homo* (DASH)-Cryptochrom zu finden. Dieses wird auch als *cry3* bezeichnet und in einem späteren Kapitel genauer betrachtet (siehe 1.3).

Das erste molekular charakterisierte Cryptochrom war das der Pflanze *Arabidopsis thaliana*. In einem Mutantenscreen zeigte die ursprünglich als *hy4* bezeichnete Mutante eine stark verringerte Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums unter Blaulicht (Koornneef *et al.*, 1980). Das Gen zu identifizieren, welches diesen Phänotyp vermittelte, war erst deutlich später möglich (Ahmad und Cashmore, 1993) und wurde als *CRY1* bezeichnet. Zeitgleich wurde in der Pflanze *Sinapsis alba* ein Cryptochrom-Gen gefunden und publiziert, wobei hier zunächst nicht klar war, dass es sich um einen Photorezeptor handelt (Batschauer, 1993). Eine Mutation im *CRY2*-Gen wurde 1991 aufgrund eines veränderten Blühverhaltens erstmals beschrieben, damals als *fha-1* bezeichnet (Koornneef *et al.*, 1991) und 1998 schließlich als *cry2*-Mutante identifiziert (Guo *et al.*, 1998). Neben der Steuerung von Wachstum und Entwicklung sind Cryptochrome sowohl in Pflanzen als auch in Tieren am Stellen der Inneren Uhr beteiligt (Liu *et al.*, 2011b).

Die beiden pflanzlichen Cryptochrome aus *Arabidopsis thaliana* sind aus einer *photolyase homology region* (PHR) und dem *cryptochrome C-terminus* (CCT) aufgebaut welcher das DQXVP-acidic-STAESSS-Motiv (DAS-Motiv) enthält (siehe Abbildung 1.3) (Lin und Shalitin, 2003). Dabei handelt es sich um drei Sequenzabschnitte, die in pflanzlichen Cryptochromen konserviert sind, nämlich das DQXVP-Motiv, ein Motiv mit 3-5 sauren Aminosäuren und das STAES welches von GGXVP gefolgt wird. Das DAS-Motiv ist auch in *cry3* konserviert, befindet sich hier jedoch am N-Terminus.

In der PHR sind zwei Chromophore nicht kovalent gebunden: Flavinadenindinucleotid (FAD) und das Pterin-Derivat 5,10-methenyltetrahydrofolat (MTHF). Zumindest in den Photolyasen ist FAD für die katalytische Funktion essentiell, während MTHF als Antennenpigment fungiert (Sancar, 2003). Ähnliches ist auch für die Cryptochrome zu vermuten. Untersuchungen an rekombinant exprimiertem *cry1* haben gezeigt, dass FAD in der vollständig oxidierten Form (FAD_{ox}) an das Protein gebunden wird. Die FAD_{ox}-Form absorbiert sehr stark im Blaulicht, mit einem Maximum bei etwa 450 nm. Die Belichtung der PHR-Domäne führt zur Bildung des neutralen Semiquinon-Radikals FADH• (Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2003; Bouly *et al.*, 2007). Die Bildung von FADH• findet bei Belichtung innerhalb von wenigen Mikrosekunden statt, dies beinhaltet nicht nur den Elektronentransfer, sondern auch den eines Protons (Langenbacher *et al.*, 2009). Allerdings ist diese Form instabil und so kommt es im Dunkeln zur Rückreaktion zum vollständig oxidierten

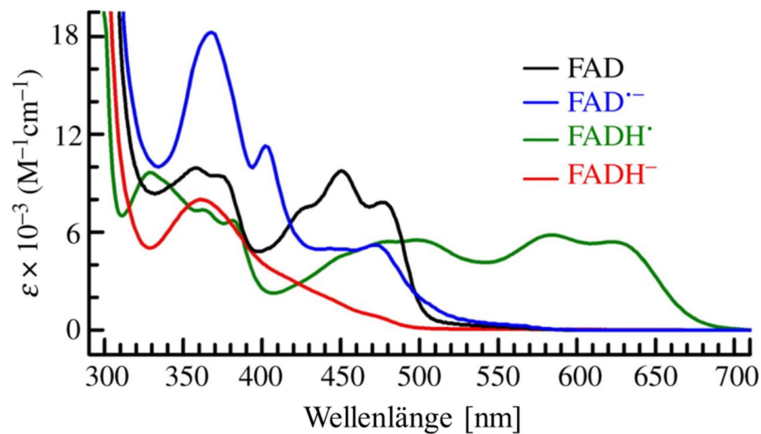


Abbildung 1.4 Absorptionsspektren der unterschiedlichen Redoxzustände von Flavin.

Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der einzelnen Redoxzustände ausgewählter Cryptochrome/Photolyasen. Verwendet wurde Mosquito AgCRY1 mit oxidiertem FAD (schwarze Linie) oder dem anionischen Semiquinon-Radikal $\text{FAD}^{\bullet-}$ (blaue Linie) und *E. coli* Photolyase mit dem neutralen Semiquinon Radikal FAD^{\bullet} (grüne Linie) oder dem vollständig reduzierten FADH^- (rote Linie). Modifiziert nach Evans *et al.*, 2013 bzw. Liu *et al.*, 2010.

FAD (Chaves *et al.*, 2011). Herbel *et al.* haben *in vivo* die Halbwertszeit des *signaling states* der pflanzlichen Cryptochrome aus *Arabidopsis thaliana* bestimmt und kamen auf etwa 5 min für cry1 und 16 min für cry2 (Herbel *et al.*, 2013).

Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass FADH^{\bullet} der *signaling state* des Flavins ist. Hierüber kann auch der inhibierende Effekt erklärt werden, den Grünlicht auf Cryptochrom-Antworten ausübt. Absorptionsspektren des neutralen Semiquinons zeigen eine deutliche Schulter im grünen Bereich des Lichtspektrums, die Belichtung in diesem Wellenlängenbereich fördert die Rückreaktion zu FAD (Banerjee *et al.*, 2007, Sellaro *et al.*, 2010) (siehe Abbildung 1.4).

Die Lichtwahrnehmung in Cryptochromen findet also über die PHR-Domäne statt, gleichzeitig ist diese Domäne auch direkt an Protein-Protein-Interaktionen wie der Dimerisierung beteiligt und zusammen mit der CCT für die Signalweiterleitung und Funktion der pflanzlichen Cryptochrome entscheidend (Yang *et al.*, 2000; Rosenfeldt *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2005). Aktuell wird davon ausgegangen, dass die PHR-Domäne und der CCT im Dunkeln in einer Art geschlossenen oder inaktiven Form vorliegen. Die Absorption von Blaulicht führt dann zu einer Konformationsänderung, die auch als Öffnung bezeichnet wird und damit dem Übergang in den aktiven Zustand. Darüber können Bereiche im CCT zugänglich werden, die für die Signalweiterleitung entscheidend sind (Liu *et al.*, 2016). An dieser Konformationsänderung könnten Phosphorylierungen beteiligt sein, die in beiden Cryptochromen schon nach kurzzeitiger Blaulichtbestrahlung nachzuweisen sind und die beiden Proteinteile über eine elektrostatische Abstoßung auseinander drücken könnten (Liu *et al.*, 2011b, Christie *et al.*, 2015). Die Bindung von ATP an cry1 wäre im Einklang mit dessen nachgewiesener Autophosphorylierungs-Aktivität, obwohl keine klassische Kinase-Domäne in cry1 vorhanden ist (Bouly *et al.*, 2003). Für cry2 konnten Casein-Kinasen identifiziert werden, deren

Aktivität zu einer Phosphorylierung des Photorezeptors führt. Die Phosphorylierung von cry2 leitet dabei die spätere Ubiquitinierung und schließlich den Abbau des Proteins ein (Tan *et al.*, 2013).

Während in dem CCT von cry2 eine NLS gefunden werden konnte (Kleiner *et al.*, 1999), ist für cry1 kein solches Lokalisationssignal bekannt. Sowohl cry1 als auch cry2 sind trotzdem beide hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wobei gewisse Mengen an cry1 auch im Cytoplasma zu finden sind und sich dieser Photorezeptor zwischen beiden Kompartimenten hin und her zu bewegen scheint (Wu und Spalding, 2007). Ein grundlegender Unterschied zwischen den beiden Photorezeptoren ist, dass cry2 im Blaulicht ubiquitiniert und abgebaut wird, während cry1 im Blaulicht stabil ist. Der Abbau scheint dabei durch SPA zusammen mit COP1 und phyA kontrolliert zu werden (Weidler *et al.*, 2012). Es wurde lange angenommen, dass dieser blaulichtabhängige Proteinabbau dazu führt, dass cry2 bevorzugt unter schwächeren Lichtbedingungen agiert. Kürzlich konnten jedoch auch deutliche Unterschiede in der Homo- und Heterodimerisierung von cry1 und cry2 festgestellt werden (Liu *et al.*, 2020). Die lichtabhängige Dimerisierung wird dabei als Photooligomerisierung bezeichnet und ist für die biologische Funktion essentiell. Nach der Elektronentransferreaktion während der cry2 Photoreduktion, ist die Photooligomerisierung die schnellste bekannte Photoreaktion von cry2. Dies führt zu der Hypothese, dass die Photooligomerisierung eine der ersten Lichtreaktionen in diesem Photorezeptor ist (Liu *et al.*, 2020). Die Photooligomerisierung von cry2 ist dabei im Vergleich zu cry1 wesentlich sensitiver gegenüber Blaulicht und die cry2 Oligomere zeigen im Dunkeln eine längere Halbwertszeit. Diese unterschiedlichen Eigenschaften der Photooligomerisierung könnten erklären, wieso cry1 und cry2 als Starklicht- und Schwachlicht-Rezeptoren fungieren. (Liu *et al.*, 2020). Die Photooligomerisierung ist dabei ein kontrollierter Prozess in Pflanzenzellen. Bekannte, negative Regulatoren der Dimerisierung sind die *Blue-Light Inhibitor of Cryptochromes* 1 und 2 (BIC1 und BIC2) (Wang *et al.*, 2018b). Eine *bic1bic2*-Doppelmutante zeigt dabei eine Hyperaktivität gegenüber allen bekannten Blaulichtreaktionen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Transkription der BICs lichtgesteuert ist und über einen Cryptochrom-, Phytochrom-, COP1- und HY5-abhängigen Weg kontrolliert wird. Die BICs könnten somit auch an der Steuerung der Zusammenarbeit von Phytochromen und Cryptochromen beteiligt sein (Wang *et al.*, 2017). Eine ähnliche Rolle können so genannte *Photoregulatory Protein Kinases* (PPKs) spielen. Diese Gruppe von Kinasen steuert über Phosphorylierungen die Aktivität und Häufigkeit von cry2, PIF3 und phyB und lässt daher den Schluss zu, dass die PPKs eine Rolle bei der Zusammenarbeit von Cryptochromen und Phytochromen spielen, auch wenn noch nicht alle Zusammenhänge im Detail verstanden sind (Wang *et al.*, 2018a).

Ein weiteres Zeichen für die starke Zusammenarbeit und Integration der über Phytochrome und Cryptochrome wahrgenommenen Lichtsignale sind die vielen gemeinsamen, nachgeschalteten

(*downstream*) Interaktionspartner dieser Photorezeptoren. So konnte gezeigt werden, dass lichtaktivierte (*photoexcited*) Cryptochrome mit PIF4 und PIF5 interagieren. Die Interaktion findet über die PHR Domäne der Cryptochrome und die N-terminale Domäne der PIFs statt. Die Regionen innerhalb der PIFs, mit denen Cryptochrome bzw. Phytochrome gebunden werden, sind dabei unterschiedlich. Als Resultat der Cryptochrom-PIF Interaktion konnte eine Hypokotylelongation unter schwachem Blaulicht beobachtet werden und es wird vorgeschlagen, dass diese Interaktion Teil der Schattenvermeidungsreaktion sein kann (Wang *et al.*, 2018b).

Des Weiteren interagieren die pflanzlichen Cryptochrome mit dem Komplex der E3-Ubiquitinligase COP1 und SPA1 (Wang *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2011a, Zuo *et al.*, 2011). Wie bereits im Zusammenhang mit Phytochromen erläutert, initiiert der COP1/SPA1-Komplex den Abbau von Transkriptionsfaktoren wie HY5, welche positive Regulatoren der Photomorphogenese sind. Durch die Interaktion der Cryptochrome mit dem COP1/SPA1-Komplex wird dessen Aktivität unterdrückt und es kommt schließlich zu einer Akkumulation der Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression von Genen initiieren, die die Photomorphogenese auslösen. Dabei scheint es mindestens zwei unterschiedliche Wege zu geben, durch welche cry1 und cry2 Einfluss auf diesen Komplex nehmen. Der Erste ist die Interaktion mit SPAs. Dabei Interagieren cry1 und cry2 über unterschiedliche Domänen mit SPA1. Für cry2 ist es die N-terminale PHR-Domäne die mit der N-terminalen *kinase-like domain* von SPA1 interagiert, während der CCT von cry1 mit der C-terminalen CC-WD Domäne von SPA1 interagiert. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der unterschiedlichen Auswirkung auf den COP1/SPA1 Komplex wieder: während die cry1-SPA1-Interaktion die SPA1-COP1-Interaktion schwächt (Liu *et al.*, 2011), scheint die cry2-SPA1-Interaktion die cry2-COP1-Interaktion zu verstärken (Zuo *et al.*, 2011). In beiden Fällen wird die Aktivität des COP1/SPA1-Komplexes inhibiert und Transkriptionsfaktoren, die positive Regulatoren der Photomorphogenese sind, akkumulieren. Zusammengefasst in Wang *et al.*, 2018b.

Die pflanzlichen Cryptochrome und der UV-B-Rezeptor UVR8 können auch ohne eine Interaktion mit SPA Einfluss auf den COP1/SPA Komplex nehmen. Sowohl für die beiden Photorezeptoren als auch für Transkriptionsfaktoren, die Teil der Lichtsignaltransduktion sind, konnte ein spezifisches Motiv welches als Valin-Prolin (VP) bezeichnet wird, gefunden werden. Zu den Transkriptionsfaktoren gehören HY5, *HY5 homolog* (HYH), *CONSTANS* (CO), *CONSTANS-LIKE3* (COL3), *SALT TOLERANCE RELATED* (STO) und *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED1* (HFR1). Die Sequenzen der VPs sind dabei nicht identisch und auch die Bindung an die WD40 Domäne von COP1 scheint mit einer unterschiedlichen Affinität möglich zu sein. Während die Bindungsstärke der Transkriptionsfaktoren gleichbleibend ist, scheint die Affinität der Photorezeptoren lichtabhängig (Lau *et al.*, 2019). Lichtaktivierte Cryptochrome durchlaufen eine Konformationsänderung, die das VP-Motiv im CCT zugänglich machen könnte und so zu einer sehr hohen Affinität für die Bindestelle

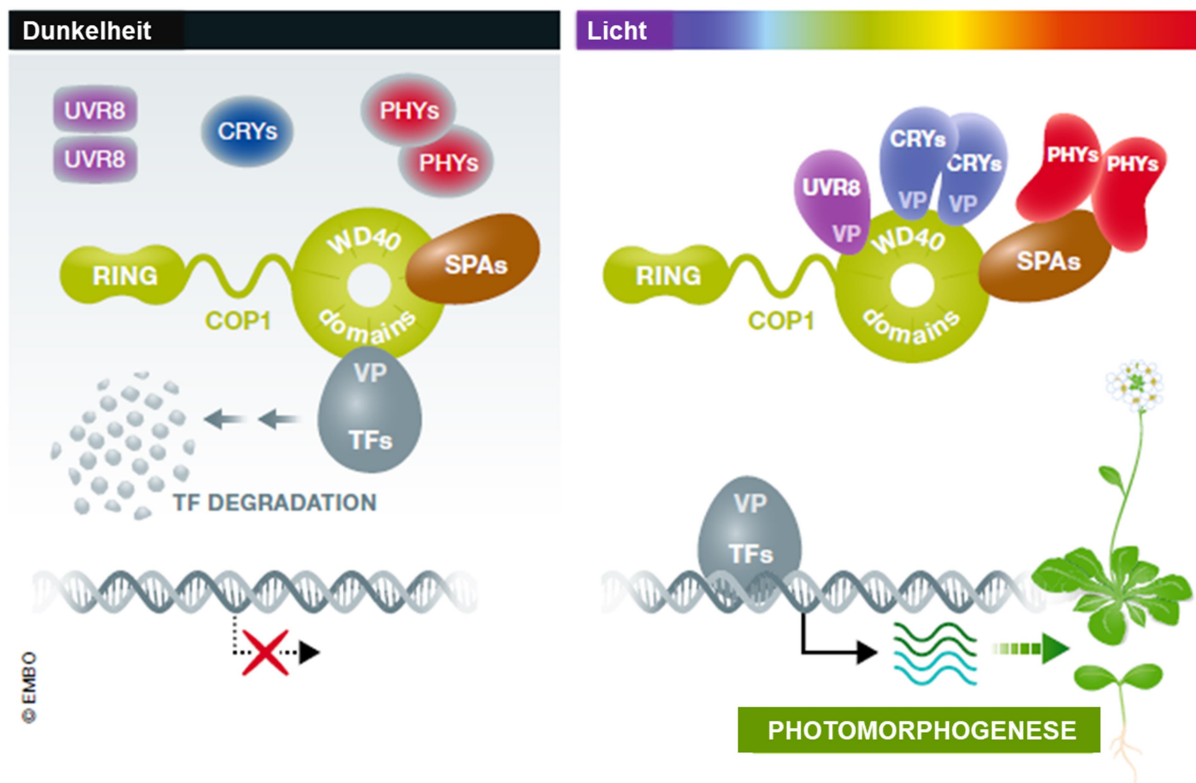


Abbildung 1.5 vereinfachtes Schema der COP1-Regulation durch Photorezeptoren.

In Dunkelheit (links) sind der UV-B-Rezeptor UVR8, die Cryptochrome (CRY) und die Phytochrome (PHY) inaktiv und die VP-Motive in UVR8 und den CRYs sind nicht zugänglich. Der COP1/SPA1-Komplex interagiert mit dem VP-Motiv von Transkriptionsfaktoren (wie z.B. HY5) und bedingt damit deren Degradation. Dies resultiert in einer geringen Transkription der lichtaktivierten Gene. Durch Licht entsprechender Wellenlänge (rechts) kommt es zur Monomerisierung bzw. Dimerisierung von UVR8 und CRYs. Die Konformationsänderung führt dazu, dass die VPs zugänglich werden. Die VPs der aktiven UVR8 und CRYs interagieren mit den WD40-Domänen (domains) von COP1, um die VPs der Transkriptionsfaktoren zu verdrängen und somit die Interaktion zu unterdrücken. Die Transkriptionsfaktoren werden nicht abgebaut und die Transkription der lichtaktivierten Zielgene (Wellenlinien) kann initiiert werden, resultierend in der Photomorphogenese der Pflanze. Die Pr Form der Phytochrome wird in den Zellkern importiert und interagiert mit SPAs um COP1 zu inhibieren (der Mechanismus ist nicht dargestellt). Verändert nach Wang und Lin, 2019.

(VP-binding pocket) in der COP1-WD40-Domäne führt. Dadurch scheinen die Photorezeptoren in der Lage, die Transkriptionsfaktoren der Lichtsignaltransduktion kompetitiv von COP1 zu verdrängen (siehe für UVR8 auch 1.2.3). Hieraus resultiert ebenfalls die Akkumulation der Transkriptionsfaktoren und Initiation der Photomorphogenese (Wang und Lin, 2019).

Neben der Beteiligung an der Deetiolierung ist cry2 auch ein wichtiger Regulator der Blühinduktion. Es konnte gezeigt werden, dass cry2 blaulichtabhängig mit dem *cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein* (CIB1) interagiert. Zusammen mit verwandten Proteinen bindet CIB1 an spezifische DNA-Motive (G-Bbox und E-Box), um die Expression von *flowering locus T* (FT) mRNA zu stimulieren und die Blütenbildung zu initiieren (Liu *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2010). CIB1 wird im Dunkeln über das 26S-Proteasom abgebaut. Blaulicht inhibiert diesen Effekt zwar, doch scheint dies nicht durch cry2 vermittelt zu sein. Vielmehr sind daran zwei Photorezeptoren mit *light oxygen voltage* (LOV)-Domänen beteiligt: *zeitlupe* (ZTL) und *lov kelch protein 2* (LKP2). Dies führte zu der

Schlussfolgerung, dass diese evolutionär nicht verwandten Photorezeptoren auf unterschiedliche Weise den gleichen Transkriptionsfaktor blaulichtabhängig regulieren (Liu *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Phototropine

LOV-Domänen kommen in *Arabidopsis thaliana* außer in ZTL und LKP2 auch in dem mit diesen nah verwandten *flavin-binding kelch repeat 1* (FKF1) und den Phototropinen 1 und 2 vor (siehe Abbildung 1.3). Die Phototropine tragen ihren Namen, da sie den Phototropismus, also das Wachstum bzw. die Streckung zu einer Lichtquelle hin oder davon weg, regulieren. Darüber hinaus sind sie auch für die Chloroplastenbewegungen und das Öffnen der Stomata entscheidend (Briggs und Christie, 2002). Die Phototropine enthalten zwei LOV-Domänen, in denen das Flavinmononukleotid (FMN) zunächst nicht kovalent gebunden wird. Die inaktive, im Dunkeln vorliegende Form des Chromophors ist dabei die vollständig oxidierte mit einem Absorptionsmaximum im blauen Spektralbereich (450 nm) (Christie *et al.*, 2015). Die Absorption von Blaulicht löst in den Phototropinen einen Photozyklus aus, während dem der Chromophor, über eine Thioether-Brücke, an ein konserviertes Cystein in der LOV-Domäne gebunden wird. Das so entstandene FMN-Cysteinyll zeigt keine Absorption im Blaulicht, sondern nur noch im nahen UV-Bereich (390 nm). (Salomon *et al.*, 2000; Swartz *et al.*, 2001) Diese photochemische Reaktion ist komplett reversibel, wobei die Geschwindigkeit von der jeweils beteiligten LOV-Domäne abhängt. Neben den LOV-Domänen weisen die Phototropine auch eine Serine/Threonine-Kinase am C-Terminus auf, die blaulichtabhängig aktiviert wird und zu einer Autophosphorylierung des Proteins führt (Swartz *et al.*, 2001). Diese Phosphorylierungen sind entscheidend für die weitere Signaltransduktion, wobei spezifische Phosphorylierungsstellen für die Interaktion mit verschiedenen Partnern essenziell sind (Christie *et al.*, 2015).

Phototropine gehören zu der Klasse der AGCVIII-Kinasen, sind aber im Gegensatz zu anderen Mitgliedern hydrophil und mit der intrazelluläre Seite der Plasmamembran und der äußeren Chloroplastenmembran assoziiert (Christie *et al.*, 2018)(Kong *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu Cryptochromen und Phytochromen sind die Phototropine somit nicht im Zellkern lokalisiert und interagieren folglich nicht direkt oder indirekt mit Transkriptionsfaktoren. Blaulicht initiiert eine Dissoziation der Phototropine von der Plasmamembran, wobei phot1 ins Cytoplasma entlassen wird und phot2 mit dem Golgi-Apparat assoziiert (Christie *et al.*, 2015).

Der Phototropismus wird hauptsächlich durch einen lateralen Auxingradienten ausgelöst, der durch einen Phosphorylierungsgradienten in den Phototropinen bedingt wird. Am Aufbau dieses Gradients ist die Umverteilung von PINs beteiligt, einer Familie der *auxin efflux carrier* (Christie, 2007). Die genauen Mechanismen der Signaltransduktion sind noch nicht im Detail verstanden, doch wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Proteine identifiziert, die zum Beispiel

lichtabhängig mit Phototropinen interagieren und/oder Teil der Signaltransduktion zu sein scheinen. Zu den am besten beschriebenen gehören Proteine der NRL-Familie, die nach ihren Vertretern *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3* (NPH3) und *ROOT PHOTOTROPISM 2* (RPT2) benannt ist (*NPH3/RPT2-Like* (NRL)). Diese Proteine teilen sich drei wesentliche Domänen: eine BTB (*bric-a-brac*, *tamtrack* und *broad complex*) am N-Terminus, eine NPH3-Domäne und eine C-terminale *coiled-coil* Domäne. Insgesamt gibt es in *Arabidopsis* 33 Proteine, die der NRL Familie zugeordnet werden können; Funktionen wurden bisher für 10 dieser Proteine gefunden (Christie *et al.*, 2018). NPH3 und RPT2 sind für einige Auxin-vermittelte Prozesse essentiell, wie den Phototropismus, die Positionierung der Blätter und die Blatt-Expansion (Christie *et al.*, 2015). Auch andere Mitglieder der NRL, die unabhängig von den Phototropinen agieren, haben einen Einfluss auf die Auxinverteilung und arbeiten dabei mit anderen ACVIII Kinasen zusammen. NRL-Proteine stellen damit einen wichtigen Baustein der Signaltransduktion für Auxin-abhängige Prozesse dar (Christie *et al.*, 2018).

NPH3 ist an der Plasmamembran lokalisiert und interagiert über seine C-terminale Domäne mit phot1 (Motchoulski und Liscum, 1999). Diese Interaktion wird durch eine Belichtung mit Blaulicht transient gelöst und die Fusion von NPH3 mit *yellow fluorescent protein* (YFP) lokalisiert in *microdomain*-Aggregaten im Cytosol. Bei einer längeren Belichtungsdauer oder Dunkelheit lösen sich diese *microdomains* wieder auf, die Formation scheint damit reversibel zu sein. Da ein sehr ähnliches Verhalten für die Phosphorylierung von NPH3 beobachtet wurde, wird angenommen, dass diese Phosphorylierungen notwendig sind, um einen aktiven Signalkomplex mit phot1 an der Plasmamembran zu bilden. Wie auch in Abbildung 1.6 dargestellt, liegt NPH3 im Dunkeln

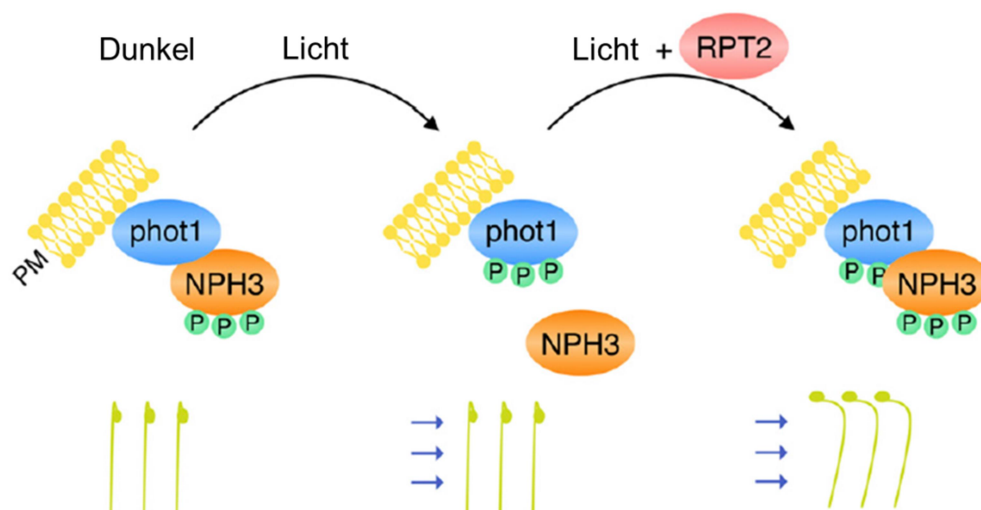


Abbildung 1.6 Die Rolle von NPH3 und RPT2 in der Signaltransduktion von phot1.

Im Dunkeln interagiert phot1 mit phosphorylierten NPH3. Durch Blaulicht und die damit einhergehende Aktivierung von phot1 wird diese Interaktion gelöst, phot1 phosphoryliert und NPH3 dephosphoryliert. In Dunkelheit (nicht gezeigt) oder bei längerer Belichtung mit Blaulicht kann NPH3 wieder phosphoryliert werden und einen Komplex mit phot1 bilden. Im Licht sind diese Phosphorylierung und Interaktion abhängig von RPT2. Verändert nach Christie *et al.* 2018.

phosphoryliert vor und wird nach der Aktivierung von phot1 innerhalb von Minuten dephosphoryliert. Bei länger anhaltender Belichtung oder Dunkelheit wird NPH3 wieder phosphoryliert und es scheint sich erneut ein phot1-NPH3-Komplex an der Plasmamembran zu bilden. Die Phosphorylierung scheint damit für die Ausbildung dieses Komplexes essentiell zu sein. Dabei scheint die Ausbildung des phot1-NPH3-Komplexes unter kontinuierlicher Belichtung nur möglich, wenn RPT2 vorhanden ist. RPT2 kann direkt mit NPH3 und phot1 interagieren. Während die Expression von RPT2 in etiolierten Keimlingen kaum zu beobachten ist, wird die Expression blau- und rotlichtabhängig induziert. Passend dazu zeigten Mutantenanalysen, dass RPT2 für den Phototropismus unter stärkerem Blaulicht essentiell ist, vermutlich durch die Beteiligung an dem Phosphorylierungsstatus und der Lokalisation von NPH3 (Christie *et al.*, 2018).

Neben dem Phototropismus sind NPH3 und RPT2 auch für die Positionierung und Expansion der Blätter entscheidend, ein Prozess der durch phot1 und phot2 reguliert wird und durch differentielles Wachstum und vermutlich die Auxin-Verteilung vermittelt wird. Die Untersuchung von verschiedenen Mutanten (unter anderem *rpt2*, *phot1rpt2*, *phot2rpt2*) ergab folgendes Modell: RPT2 ist nicht nötig für die phot2-Signalweiterleitung, RPT2 scheint hingegen den inhibitorischen Effekt von phot1 auf phot2 zu unterdrücken (Christie *et al.*, 2018).

Eine weitere wesentliche Komponente der NPH3- und RPT2-abhängigen Signaltransduktion der Phototropine sind *PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE PROTEINS* (PKS1 bis PKS4). Es ist bekannt, dass die PKS-Proteine an der Plasmamembran lokalisieren und mit phot1, phot2 und NPH3 assoziiert sind. Auch konnten Mutantenanalysen eine Beteiligung am Phototropismus, der Blatt-Positionierung und Blatt-Expansion zeigen. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch weitgehend unbekannt.

Wie bereits erwähnt, sind NRL-Proteine auch an einer Signalweiterleitung abseits von Auxin beteiligt, dazu gehört die Chloroplastenbewegung. Die Chloroplastenbewegung ist zellautonom und findet unabhängig von der Genexpression statt. Unter schwachem Blaulicht arbeiten phot1 und phot2 zusammen, um die Chloroplasten an die gewünschte Stelle innerhalb der Zelle zu bringen und so die Ausbeute der Photosynthese zu maximieren. Die lichtvermeidende Reaktion, als Schutz vor Photoschäden, wird dabei alleine durch phot2 vermittelt. Die Chloroplastenbewegung wird durch *chloroplast actin* (*cp-actin*) vermittelt und obwohl einige wichtige Proteine bekannt sind, ist der genaue Mechanismus unbekannt. Während *NRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT1* (NCH1) und RPT2 redundant für die Chloroplastenakkumulation notwendig sind, ist die phot2-gesteuerte Lichtvermeidungsreaktion der Chloroplasten hingegen unabhängig von diesen NRL-Proteinen.

Wie die Signalweiterleitung über NRLs auf biochemischer Ebene fortschreitet und so zu den physiologischen Antworten führt, ist weitestgehend unklar. Es wird spekuliert, dass die NRLs Substrat für die Ubiquitinierung und anschließende Degradation rekrutieren. Tatsächlich interagiert

NPH3 mit *CULLIN3a* (CUL3a) und ist dabei Teil der *CUL3 RING E3 UBIQUITIN LIGASE* (CRL3). Das einzige bekannte Ziel ist jedoch phot1 und während eine Polyubiquitinierung zur Degradation von phot1 führt, scheint eine Monoubiquitinierung die subzelluläre Lokalisation von phot1 zu beeinflussen (Christie *et al.*, 2018). Eine Phototropin-vermittelte Antwort, die hingegen unabhängig von NRLs und Auxin ist, ist das Öffnen der Stomata. Spezielle H^+ -ATPasen an den Schließzellen der Stomata werden aktiviert, woraufhin K^+ in die Schließzellen importiert wird. Die Schließzellen schwellen an und die Stomata werden geöffnet (Shimazaki *et al.*, 2007). Die Aktivierung der H^+ -ATPasen erfolgt durch Phosphorylierung und das Binden von 14-3-3-Proteinen. Dabei wird die Phosphorylierung der H^+ -ATPasen durch die *blue light signaling 1* (BLUS)-Kinasen vermittelt. Die BLUS selbst werden von phot1 und phot2 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Takemiya *et al.*, 2013).

1.2.2.3 Die Zeitlupefamilie

Die Proteine der Zeitlupefamilie (ztl, fkf1 und lkp2) sind im Cytoplasma und im Zellkern zu finden. Sie tragen nur eine LOV-Domäne am N-Terminus, die die Bildung von Homo- und Heterodimeren vermittelt und gleichzeitig FMN-Bindedomäne und Lichtsensor ist (Ito *et al.*, 2012). Gefolgt wird diese Domäne von einer F-Box und sechs Kelch-Wiederholungen am C-Terminus (siehe Abbildung 1.3). Die F-Box ist Teil des *SKP1–Cullin–Rbx1–F-box protein* (SCF)-E3-Ligasekomplexes und die Kelch-Wiederholungen sind an der Erkennung des zu ubiquitinierenden Zielproteins beteiligt (Takase *et al.*, 2011). Die Zeitlupefamilie kontrolliert damit das biologische *timing* in *Arabidopsis thaliana* durch die Regulation von Zielproteinen, die eine Schlüsselrolle für die circadiane Rhythmik und die Induktion der Blüte haben. Ztl beeinflusst dabei zum Beispiel lichtabhängig die Stabilität des Transkriptionsfaktors *transcriptional repressor timing of CAB Expression* (TOC). Dabei scheint die blaulichabhängige Interaktion mit Gigantea (GI) entscheidend zu sein, einem Protein, welches in

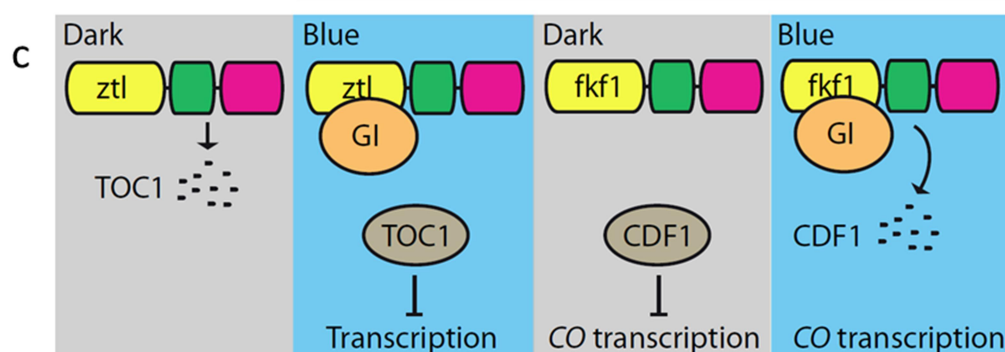


Abbildung 1.7 Frühe Signalweiterleitung in der Zeitlupe Familie.

Im Dunkeln bewirkt ztl den Abbau von TOC1, im Blaulicht führt die Bindung von GI zur Akkumulation von TOC1 und circadiane Gene werden auf transkriptioneller Ebene reprimiert, indem die SCF^{ztl} Aktivität inhibiert wird. Das blaulichtinduzierte Binden von GI an fkf1 führt zu der Degradation des transkriptionellen Repressors CDF1 und somit zur CO-Expression und dem Blühen unter Langtagbedingungen. Modifiziert nach (Christie *et al.*, 2015).

Zusammenhang mit der inneren Uhr und dem Blühzeitpunkt steht. Im Fall von *ztl* inhibiert die Interaktion mit GI die SCF und Zielproteine wie TOC1 können im Licht akkumulieren (siehe auch Abbildung 1.7). Umgekehrt verläuft die Regulation durch *fkf1*; zwar findet auch hier im Licht eine Interaktion der LOV-Domäne mit GI statt, doch wirkt sich diese positiv auf die Aktivität der SCF von *fkf1* (SCF^{fkf1}) aus und die Zielproteine werden im Licht abgebaut. Zielproteine von *fkf1* sind *cycling DOF factors* (CDFs) und andere Proteine, die die Transkription von *CONSTANS* (CO) und FT reprimieren. Unter Langtagbedingungen werden diese Repressoren *fkf1*-vermittelt abgebaut und es kommt zu Blühinduktion (Christie *et al.*, 2015).

1.2.3 Der UV-B-Photorezeptor UVR8

Erst vor wenigen Jahren konnte der UV-B-Rezeptor UVR8 identifiziert werden (Rizzini *et al.*, 2011). Durch geringe Dosen UV-B-Strahlung werden zahlreiche Prozesse gesteuert, zu denen die Morphogenese, Stoffwechselvorgänge, die Photosynthese, Schutz vor UV-Strahlung, aber auch Abwehr gegen Pathogene und Fraßfeinde gehören (Jenkins, 2014). Besonders interessant an UVR8 ist, dass er keinen Chromophor im eigentlichen Sinne besitzt. Stattdessen weist das Protein konservierte Tryptophane auf, die sensitiv auf UV-Strahlung reagieren. Das etwa 47 kDa große Protein liegt in der Zelle als Dimer vor und bildet eine Donut-artige Struktur. Nach Absorption von UV-B-Strahlung kommt es zu einer Dissoziation des Dimers. Diese Monomerisierung ist für die Signaltransduktion entscheidend. Es wird angenommen, dass durch die Anregung einer Tryptophan „Pyramide“ Salzbrücken geschwächt werden, die für den Zusammenhalt des Dimers entscheidend sind (Christie *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Mutantanalysen haben diese Theorie, dass Salzbrücken nach Anregung gelockert werden, bestärkt (Heilmann *et al.*, 2016). Die Re-Dimerisierung von UVR8 wird in Pflanzenzellen durch *repressor of UV-B photomorphogenesis* (RUP)-Proteine unterstützt, welche daher negative Regulatoren der UV-B-Signaltransduktion sind (zusammengefasst von Jenkins, 2014).

Die Monomere werden in den Zellkern transloziert und können mit COP1, einem bekannten Bestandteil von Lichtsignaltransduktionswegen, interagieren und so Einfluss auf die Genexpression nehmen. In UVR8 konnte genau wie in den pflanzlichen Cryptochromen und wichtigen Transkriptionsfaktoren der Photomorphogenese VP-Motive identifiziert werden. Lichtaktiviertes UVR8 bindet mit sehr hoher Affinität COP1 und verdrängt die Transkriptionsfaktoren kompetitiv (siehe auch 1.2.2.1). Darüber hinaus ist UVR8 aber auch unabhängig von COP1 aktiv, so wurde auch eine direkte Interaktion und Inhibierung von Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die Hypocotylelongation vermitteln (Lau *et al.*, 2019; Wang und Lin, 2019).

1.3 Photolyasen und DASH-Cryptochrome

Das im Sonnenlicht enthaltene, sehr energiereiche UV-Licht birgt für Pflanzen und alle anderen Organismen Gefahren. Neben der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt es besonders zur direkten Schädigung der DNA. Die UV-Strahlung kann dabei die Entstehung kovalenter Bindungen zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen initiieren. Ein sogenanntes Pyrimidindimer entsteht und die DNA-Helix wird durch einen „Knick“ deformiert. Durch die Absorption von UV-Licht können zwei unterschiedliche Arten von Dimeren entstehen: die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und die 6-4-Pyrimidine-Pyrimidone ((6-4)-Photoprodukte). Letztere machen nur etwa 20-30% der Photoprodukte aus und CPDs sind somit die häufigsten direkten DNA-Schäden (Thoma, 1999). Zur Reparatur dieser Schäden haben sich spezielle Enzyme entwickelt, die so genannten Photolyasen. Je nach dem, welcher Schaden repariert wird, werden die Enzyme auch als CPD- bzw. 6-4-Photolyasen bezeichnet. Diese Enzyme sind sehr weit verbreitet und in nahezu allen Prokaryoten, Eukaryoten und sogar einigen viralen Genomen zu finden (Chaves *et al.*, 2011). Um diese Schäden zu reparieren, nutzen Photolyasen blaues und UV-A-Licht mit einer Wellenlänge von etwa 350 nm bis 500 nm (Sancar, 2003). Zur Aufnahme der Lichtenergie haben Photolyasen neben FAD einen weiteren Chromophor gebunden, der als Antenne fungiert. Meist ist dies das Folat MTHF, bei einigen Photolyasen aber auch das Flavinderivat 8-hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin (8-HDF) (Sancar, 2003), FAD oder FMN (Klar *et al.*, 2006). Auch gibt es in Bakterien Vertreter der Familie der Cryptochrome und Photolyasen, die über Fe-S-Cluster und 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine als Antennenchromophore verfügen (Hendrischk *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Oberpichler *et al.*, 2011). Um einen Schaden zu reparieren, muss das Flavin als vollständig reduziertes FADH^- vorliegen. Das Aktionsspektrum von Photolyasen weist jedoch kaum Übereinstimmungen mit dem Absorptionsspektrum dieser Form des Flavins auf. Stattdessen entspricht das Aktionsspektrum weitestgehend den Absorptionseigenschaften des entsprechenden Antennenchromophores. Folglich muss die von der Antenne aufgenommene Lichtenergie auf das Flavin übertragen werden, dies geschieht über den sogenannten Resonanztransfer. Der Chromophor geht dadurch in die angeregte Form FADH^* über und kann nun ein Elektron auf das Pyrimidindimer übertragen. Das Dimer wird gespalten und der Schaden repariert (Sancar, 2003; Chaves *et al.*, 2011).

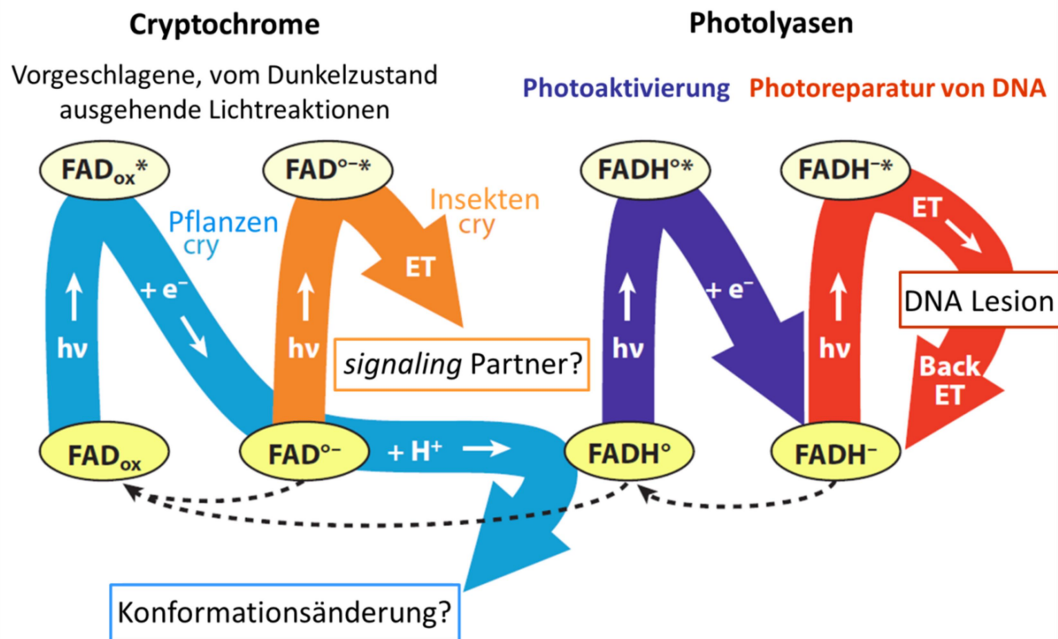


Abbildung 1.8 Lichtreaktion in Photolyasen und Cryptochromen.

Der Grundzustand sowie die biologisch aktive Form von FAD ist in den einzelnen Klassen von Flavoproteinen unterschiedlich. Die Anregung des jeweiligen Oxidationszustands von FAD ist mit $h\nu$ gekennzeichnet, die Aufnahme eines Elektrons über die Tryptophantriade mit $+e^-$ und die Protonierung durch $+H^+$. ET deutet den Elektronentransfer von FAD zu einem Substrat an. Die Ellipsen stehen für den Proteinteil und die gestrichelten Pfeile kennzeichnen die lichtunabhängige Reoxidation. Wie die primäre Signalweiterleitung in Cryptochromen stattfindet, ist nicht zweifelsfrei bewiesen. Modifiziert nach Chaves *et al.*, 2011 und Kao *et al.*, 2008.

Die PHR-Domäne der pflanzlichen Cryptochrome weist zwar eine große Ähnlichkeit zu den Photolyasen auf, doch sind diese Photorezeptoren nicht in der Lage, DNA-Schäden zu reparieren. Wie in 1.2.2.1 beschrieben, nutzen sie die Lichtenergie als Informationsquelle und steuern so die blaulichtabhängige Photomorphogenese. In aufgereinigten Photolyasen und Cryptochromen konnten unterschiedliche Oxidationszustände von FAD gefunden werden (siehe Abbildung 1.8). Während die Oxidation des Flavins lichtunabhängig stattfindet, wird die Reduktion von Licht getrieben. In Photolyasen wird die Reaktion vom semireduzierten, neutralen Radikal $FADH^\bullet$ (dem akkumulierten Zustand von FAD) hin zur vollständig reduzierten Form auch als Photoaktivierung bezeichnet. Auf die angeregte Form $FADH^{ox*}$ wird ein Elektron übertragen und diese so in die vollständig reduzierte Form überführt. Das Elektron wird dabei von einem konservierten Tryptophan bezogen, das Teil der so genannten Tryptophantriade ist. Die Triade setzt sich aus drei Tryptophanen in konservierten Positionen zusammen. Die Elektronenlücke, die am innersten Tryptophan durch die Abgabe eines Elektrons entsteht, wird durch das mittlere aufgefüllt und so weiter. Das zuletzt entstandene Radikal befindet sich an der Proteinoberfläche und gibt ein Proton an die wässrige Phase ab. Über eine Reduktion kann das ungeladene Radikal nun in den Ursprungszustand zurückkehren (Chaves *et al.*, 2011; Byrdin *et al.*, 2003). In den pflanzlichen Cryptochromen scheint nicht die vollständig reduzierte Form von FAD zu akkumulieren, sondern das neutrale Semiquinon-Radikal $FADH^\bullet$. In Cryptochrom aus Insekten wird hingegen vor allem das

anionische Semiquinon-Radikal $\text{FAD}^{\cdot-}$ gebildet (siehe Abbildung 1.8) (Chaves *et al.*, 2011). Diese Oxidationsstufen des Flavins sind zwar nicht in der Lage einen DNA-Schaden zu reparieren, doch scheinen sie die Signaltransduktion in den Photorezeptoren zu initiieren.

1.3.1 DASH Cryptochrome und Cry3 aus *Arabidopsis thaliana*

Cry3 aus *Arabidopsis thaliana* kann im Gegensatz zu den pflanzlichen Cryptochromen *in vitro* durchaus die vollständig reduzierte Form FADH^- akkumulieren (Song *et al.*, 2006). Dieses Flavoprotein gehört zu der Gruppe der DASH-Cryptochrome. Die Abkürzung steht dabei für *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und *Homo* und wurde 2003 auf Grund von phylogenetischen Untersuchungen eingeführt, die eine Verwandtschaft zwischen den Cryptochromen dieser Spezies nahe legten (Brudler *et al.*, 2003). Neuere Untersuchungen stellen jedoch diese Verwandtschaft in Frage. So scheinen *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* keine DASH-Cryptochrome zu besitzen (Oztürk *et al.*, 2008). Phylogenetische Untersuchungen zeigten für die DASH-Cryptochrome eine Nähe zu (6-4) Photolyasen und tierischen Cryptochromen (Mei und Dvornyk, 2015).

Cry3 unterscheidet sich in einigen Punkten deutlich von den anderen beiden Cryptochromen in *Arabidopsis thaliana*. Betrachtet man die Domänenstruktur (Abbildung 1.3), so fällt auf, dass die C-terminale Extension fehlt, die bei cry1 und cry2 das DAS Motiv enthält und an der Signaltransduktion beteiligt ist. Stattdessen findet sich am N-Terminus ein Motiv, welches einige Ähnlichkeit zu DAS aufweist („DAS“). Ob dieses Motiv tatsächlich eine Bedeutung für die Funktion von cry3 hat, ist allerdings unklar. Homologe zu cry3 aus Reis und Tomate tragen dieses Motiv nicht, es scheint daher nicht konserviert zu sein (Klar *et al.*, 2007). Ebenfalls am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid, das den Import in die Organellen vermittelt (Kleine *et al.*, 2003).

Während noch wenige Daten zur Funktion von cry3 *in planta* vorliegen, wurde das Cryptochrom *in vitro* recht umfangreich charakterisiert. Dies schließt die Aufklärung der Struktur von cry3 ein (Pokorny *et al.*, 2005). Die Oberflächenstrukturen mit den elektrostatischen Ladungen von zwei Photolyasen, dem DASH-Cryptochrom und cry1 sind in Abbildung 1.9 dargestellt. Die roten Bereiche weisen eine negative Nettoladung auf, während blaue Bereiche insgesamt positiv geladen sind. Damit ein Schaden in der DNA repariert werden kann, muss die DNA zunächst von dem Protein gebunden werden. Da die DNA ein negativ geladenes Molekül ist, scheint es sinnvoll, dass die Furche auf der Oberfläche der Photolyasen, in der Nähe der FAD-Bindetasche, mehr positive Ladungen aufweist und so die elektrostatische Anziehung die Interaktion unterstützt. Obwohl die PHR-Domäne relativ stark konserviert ist, zeigt cry1 im Bereich der Bindetaschen vermehrt negativ oder neutral geladene Aminosäuren, was eher zu einer Abstoßung der DNA führen würde. Diese

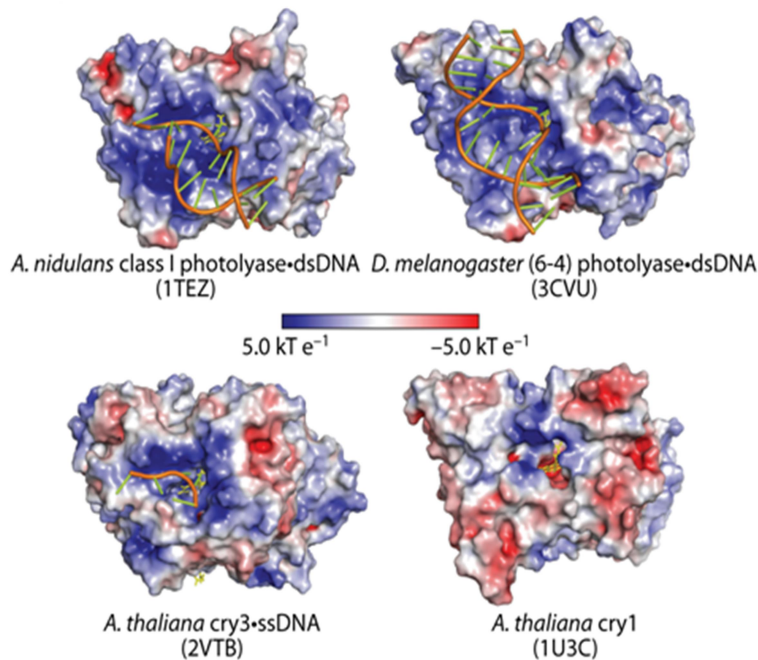


Abbildung 1.9 Kristallstruktur von Photolyasen und Cryptochromen.

Oben sind die elektrostatischen Oberflächen von zwei Photolyasen und unten von zwei Cryptochromen gezeigt. Die Photolyasen haben ein dsDNA-Substrat mit T<>T gebunden, cry3 ein Einzelsträngiges. Die Darstellung der DNA erfolgte vereinfacht als Strichmodell. Die Proteine sind mit Blick auf die FAD-Bindetasche gezeigt. Blaue Bereiche zeigen eine positive und rote eine negativ geladene Region. Die jeweiligen PDB-Codes, unter welchen die Strukturdaten zu finden sind, sind in Klammern angegeben. Verändert nach Chaves *et al.*, 2011.

Ladungsunterschiede korrelieren mit dem Umstand, dass für cry1 keine DNA-Bindung gefunden wurde. Cry3 weist in diesem Bereich deutlich mehr positive Ladungen auf als das pflanzliche Cryptochrom. Untersuchungen an rekombinant- *E. coli* exprimiertem cry3 zeigen, dass dieses tatsächlich DNA binden kann. Eine Reparatur von CPDs im Doppelstrang scheint hingegen nicht möglich. Es wird angenommen, dass das DASH-Cryptochrom nicht in der Lage ist, den CPD-Schaden in der katalytischen Tasche zu drehen. Dieses „Herausdrehen“ des Schadens aus dem Doppelstrang wird auch als *flip out* bezeichnet und ist nötig, um den Schaden in räumliche Nähe zum katalytisch aktiven FADH⁻ zu bringen (Medvedev und Stuchebrukhov, 2001; Pokorny *et al.*, 2008). Wie die Daten der Kristallstruktur nahelegen, ist das Milieu innerhalb der Flavin-Bindetasche in cry3 weniger hydrophob als in den Photolyasen, obwohl diese Bereiche eine hohe Sequenzhomologie zeigen. Der Austausch von wenigen Aminosäuren in dem DASH-Cryptochrom hat somit dazu geführt, dass die Bindung des CPDs in doppelsträngiger DNA deutlich ungünstiger ist (Pokorny *et al.*, 2008).

Wenig überraschend ist daher, dass cry3 das Fehlen einer Photolyase nicht kompensieren kann und nur eine geringe Photolyaseaktivität für DASH-Cryptochrome in Vertebraten zu beobachten war (Daiyasu *et al.*, 2004). In der Konsequenz wurde postuliert, dass es sich bei dem Flavoprotein um einen Photorezeptor handelt. Die Fähigkeit, an Nukleinsäuren zu binden und Elektronen in diese zu initiieren, könnte Teil des Signaltransduktionsmechanismus sein (Kleine *et al.*, 2003). Spätere

Untersuchungen zeigten jedoch, dass *cry3 in vitro* durchaus in der Lage ist CPDs zu reparieren, allerdings nur in einzelsträngiger DNA und Loop-Strukturen von Dublex-DNA (Pokorny *et al.*, 2008). Bei Cry3 und anderen DASH-Cryptochromen könnte es sich also auch um ssDNA-spezifische Photolyasen handeln (Selby und Sancar, 2006). Inwieweit diese Daten jedoch eine biologische Relevanz haben, bleibt fraglich. Mithilfe eines PCR-basierten Reparatur-Assays konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass *cry3 in planta* an der Reparatur von Photoschäden in Chloroplasten- und Mitochondrien-DNA beteiligt ist (Reisbacher, 2009).

1.1.1 Biologische Funktion von DASH-Cryptochromen

Sowohl in der *E. coli*-Photolyase, als auch in *cry3* kann ein Elektron vom angeregten FADH^{*} nicht nur in den Photoschaden injiziert, sondern auch auf MTHF übertragen werden (Moldt *et al.*, 2009; Hamm-Alvarez, Sancar und Rajagopalan, 1989). Das Produkt dieser Photoreduktion von MTHF ist 5,10-methylenTHF, welches eine Vorstufe zu Methionin ist (Ravanel *et al.*, 1995). Methionin kann wiederum zu S-Adenosylmethionin umgewandelt werden, welches Methylgruppendonor für die Synthese von Polyaminen und dem Phytohormon Ethylen ist. Weiterhin ist S-Adenosylmethionin auch für die Methylierung von Proteinen und DNA, sowie für die Biosynthese von Chlorophyll und Lignin notwendig. Auf Grund dieser wichtigen Bedeutung von Methionin für den C1-Metabolismus spekulierten Moldt *et al.* 2009 über eine mögliche regulatorische Funktion von *cry3* im Folatstoffwechsel. Die Expression von *cry3* wird deutlich durch Licht induziert und unterliegt gleichzeitig einer circadianen Kontrolle. Die stärkste Expression zeigt sich dabei am Beginn des subjektiven Tags, sowie wenige Stunden nach Dunkel/Licht-Übergängen (Sommer, 2010, Reisbacher, 2009). Vorstellbar wäre daher eine Funktion von *cry3* während der Deetiolierung von Keimlingen. Auch für andere frühe Enzyme des Folatstoffwechsels ist eine Lichtregulation bekannt (Jabrin *et al.*, 2003). Erschwert werden Untersuchungen zum Einfluss von *cry3* auf den Folatstoffwechsel dadurch, dass in Pflanzen mindestens drei unterschiedliche Stoffwechselwege zur Bildung von 5,10-methylenTHF führen (Rébeillé *et al.*, 2006). Zu bedenken ist auch, dass die Quantenausbeute für die Photoreduktion von MTHF nicht besonders hoch ist (Zirak *et al.*, 2009). Das Cryptochrom könnte daher vermutlich nur unter sehr hohen Fluenzraten eine nennenswerte Rolle im Folatstoffwechsel spielen.

Ein naher Verwandter von *cry3* aus *Arabidopsis thaliana* ist das DASH-Cryptochrom aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* (Syn-CRY). Bereits 2003 wurde in Microarrayanalysen festgestellt, dass die Expression von 8 Genen durch das DASH-Cryptochrom reprimiert wird (Brudler *et al.*, 2003). Neuere Untersuchungen mit Mutanten, in denen das DASH-Cryptochrom nicht exprimiert wird, lassen den Schluss zu, dass Syn-CRY für die effektive Wiederherstellung der Photoystem II Aktivität nach der Schädigung durch UV-B benötigt wird (Vass *et al.*, 2014). Die Belichtung mit sehr

starkem Licht oder UV-B führt in der Mutante zu einem deutlich stärkeren Verlust der PSII Aktivität als im Wildtyp. Dieser Unterschied war hingegen nicht vorhanden, wenn die Proteinsynthese durch Lincomycin unterdrückt wurde. Syn-CRY scheint folglich keinen direkten Einfluss auf den Schutz des PSII zu haben, sondern vielmehr Einfluss auf dessen Reparatur zu nehmen. Bei der Reparatur des PSII werden zunächst die beschädigten D1 (und D2) Untereinheiten entfernt, das Protein *de novo* synthetisiert und das funktionelle PSII-Reaktionszentrum wieder zusammengesetzt. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass besonders die Menge der D1-Untereinheit in der *syn-cry* Mutante beeinflusst wurde, während die Transkriptlevel der *psbA*-Gene (die für die D1-Untereinheit kodieren) weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Auch zeigt Syn-CRY keinerlei Einfluss auf die Reparatur von CPD-Schäden in dem Genom des Cyanobakteriums. Die Autoren schlussfolgern daher, dass die Synthese neuer D1- und evtl. D2-Untereinheiten und/oder der Zusammenbau des PSII durch Syn-CRY beeinflusst wird. Da auch einige Proteine, die im Zusammenhang mit der CO₂-Fixierung stehen (SbtA und RbcS) in der Mutante unterrepräsentiert sind, könnte die Signaltransduktion mit diesem Stoffwechselweg in Zusammenhang stehen. Möglich wäre auch eine Verbindung zu Pila1, einem Protein, welches an die Zelloberfläche abgesondert wird (Vass *et al.*, 2014).

Auch in nicht photosynthetischen Organismen scheinen cry-DASH eine regulatorische Rolle zu spielen. Besonders gut charakterisiert wurde das DASH-Cryptochrom CryD aus *Fusarium fujikuroi*, einem phytopathogenen Pilz. Das Fehlen von CryD führt zu einem deutlichen, lichtabhängigen Phänotyp. Die Morphologie und Färbung von Kolonien der *cryD*-Mutante unterscheiden sich merklich vom Wildtyp. Dieser visuelle Phänotyp ist durch die Expression des Wildtyp-Allels in der Mutante komplementierbar. Unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen zeigte sich außerdem die Bildung von speziellen Sporen in der *cryD*-Mutante, den sogenannten Macroconidien. Das Cryptochrom könnte somit ein stickstoffabhängiger Repressor der Bildung von Macroconidien in dem an der Oberfläche wachsenden und belichteten Pilz sein (Castrillo *et al.*, 2013). Des Weiteren nimmt *cryD* in *Fusarium* bei längerer Belichtung Einfluss auf die Carotinoidbiosynthese. Die Proteinmenge von wichtigen Proteinen des Carotinoid-Synthesewegs (*carRA* und *carB*) scheint dabei posttranskriptionell beeinflusst zu werden (Castrillo und Avalos, 2015).

Diese unterschiedlichen Funktionen und Phänotypen scheinen jedoch keine allgemeine Gültigkeit für DASH-Cryptochrome zu haben. In einem anderen Pilz, *Phycomyces blakesleeenanus*, scheint das cry-DASH hingegen als kanonische Photolyase zu fungieren, die CPDs in dsDNA reparieren kann (Tagua *et al.*, 2015). Dies ist bislang aber der einzige Nachweis einer Doppelstrang-Reparatur-Aktivität für DASH-Cryptochrome.

Für das DASH-Cryptochrom aus dem Bakterium *Vibrio cholera* konnten Gindt *et al.* 2015 eine Erklärung finden, wie und wann VcCry1 als Photolyase und wann als Photorezeptor fungiert. Wenn

das Cryptochrom an CPDs in UV-geschädigter DNA bindet, scheint das Flavin nur noch als Hydroquinon (FADH^-) und neutrales Semiquinon (FADH^\cdot) vorzuliegen. Die vollständig reduzierte Form FADH^- wird dabei benötigt, um den CPD-Schaden zu reparieren. Liegt VcCry1 nicht mehr gebunden an die DNA vor, sollte der in der Zelle vorherrschende pH-Wert von 7,2 dazu führen, dass FADH^\cdot destabilisiert und FAD_{ox} gebildet wird. Die FAD-Form scheint wiederum für eine Funktion als Photorezeptor essenziell und so ist VcCry1 in der Lage, Einfluss auf die circadiane Uhr zu nehmen, wenn keine CPDs in der Zelle vorliegen (Gindt *et al.*, 2015).

Eine weitere Auffälligkeit für cry-DASHs aus unterschiedlichen Organismen ist die Bindung von RNA. Werden die cry-DASHs aus dem fakultativ anaeroben Bakterium *Vibrio cholerae* und der Grünalge *Osteococcus tauri* in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt, sind an beide Proteine kleine RNAs gebunden (Worthington *et al.*, 2003b; Heijde *et al.*, 2010). Das cry-DASH aus dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa* bindet ebenfalls neben ds- und ssDNA auch ds- und ssRNA (Froehlich *et al.*, 2010) und genauso konnte für das pilzliche cryD aus *Fusarium fujikuroi* eine RNA-Bindung gezeigt werden (Castrillo *et al.*, 2015). Ob dies eine biologische Relevanz hat ist allerdings nicht klar. Es wäre möglich, dass die cry-DASH Proteine Photoschäden in RNA reparieren oder die RNAs modifizieren und darüber Einfluss auf deren Stabilität oder im Falle von mRNAs auf deren Translatierbarkeit nehmen. Auch weitere Einflüsse auf die Regulation der Genexpression über *micro RNAs* oder *small interfering RNAs* sind vorstellbar.

Neuere Untersuchungen für die Braunalge *Saccharina japonica* zeigten, dass die Expression von *sjCRY-DASH* durch eine miRNA (*novel-m3234-5p*) negativ reguliert wird (Yang *et al.*, 2020). Die Expression von *sjCRY-DASH* wird innerhalb von 30 Minuten stark durch Blaulicht induziert und zeigt eine Periodizität, die eine circadiane Kontrolle der Expression vermuten lässt. Des Weiteren konnten *long non-coding RNAs* identifiziert werden, die eine Co-Expression mit *sjCRY-DASH* zeigten und als *long intergenic non-coding RNAs* (lincRNAs) charakterisiert wurden. Aufgrund eines daraus erstellten miRNA *sjCRY-DASH* lincRNA Netzwerks prognostizieren Yang *et al.* eine indirekte Beteiligung von *sjCRY-DASH* an der Regulation der Reparatur von DNA-Schäden, Proteinsynthese und Proteinprozessierung, sowie dem Actintransport.

Das DASH-Cry aus *Arabidopsis thaliana* (cry3) ist in den Organellen lokalisiert (Kleine, Lockhart und Batschauer, 2003). Es wäre vorstellbar, dass es dort mit den vorhandenen RNAs interagiert und direkt die Translation von Proteinen in diesem Kompartiment beeinflusst. Alternativ könnte es auch direkt oder indirekt über ein retrogrades Signal die Expression von kernkodierten Proteinen beeinflussen. Stefan Reisbacher konnte zeigen, dass die Expression von cry3 einer circadianen Rhythmik unterliegt und die Expression in Keimlingen besonders durch dunkelrotes und blaues Licht induziert wird (Reisbacher, 2009). Somit wäre zum Beispiel eine Funktion während der Deetiolierung oder ein Einfluss auf die diurnale Rhythmik vorstellbar. In einer genomweiten Studie

wurde cry3 zwar nicht als Teil des zentralen Oszillators der Inneren Uhr identifiziert, wurde aber circadian reguliert und eine Beteiligung an der Antwort auf Nicotinamid (ein Metabolit, der die Periode des circadianen Rhythmus verlängert) wird diskutiert (Mombaerts *et al.*, 2019).

1.4 Zielsetzung

Während das DASH-Cryptochrom aus *Arabidopsis thaliana* *in vitro* umfangreich charakterisiert wurde, stehen wenige Daten zu seiner Funktion *in planta* zur Verfügung. Für cry3 und die anderen pflanzlichen Cryptochrome wurden die gebundenen Kofaktoren nur aus heterolog in *E.coli* bzw. Insektenzellen exprimiertem Protein bestimmt. Um die Frage zu beantworten, ob in der Ursprungspflanze die gleichen Chromophore gebunden sind, könnten Überexpressionslinien von *A. thaliana* eingesetzt werden. Diese Linien sollten das Zielprotein in weitaus größerer Menge exprimieren, als das endogene Gen. In Verbindung mit einem Affinitätstag und antikörperbasierten Methoden zur Immobilisierung soll das Protein angereichert und fluorimetrisch untersucht werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob FAD und MTHF tatsächlich die nativen Kofaktoren von cry3 sind.

Die räumliche und zeitliche Expression von cry3 *in planta* könnte wichtige Informationen über dessen biologische Funktion liefern. Dazu sollte die Expression von cry3 während der Deetiolierung und bei Dunkel/Licht-Übergängen analysiert werden, sowohl mikroskopisch, als auch auf Protein- und mRNA-Ebene.

Ebenfalls aufschlussreich könnten Analysen der cry3-Deletionsmutante sein, um die biologische Funktion von cry3 zu klären. Hierfür sollte die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums und der Einfluss der Deletion von *CRY3* auf das Chloroplastenproteom untersucht werden.

Abschließend sollten Interaktionspartner von cry3 identifiziert werden. Hierfür bieten sich direkte proteinbasierte Methoden wie die *Co-Immunoprecipitation* (CoIP) mit folgender Massenspektrometrie oder *Yeast two hybrid library screens* an.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p.A. (zur Analyse) Qualität verwendet. Sie wurden hauptsächlich von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Applichem (Darmstadt) bezogen. Bei Verwendung von Chemikalien anderer Hersteller ist dies im Text gekennzeichnet.

2.1.2 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Blotapparatur	Mini trans blot® cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ESI TOF Massenspektrometer	Orbitrap Velos Pro	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzscanner	Typhoon® TrioTM	GE Healthcare, München
Fluoreszenzmikroskop	Bx51	Olympus, Hamburg
Fluorometer	RF-5301 PC Spectrofluorometer	Shimadzu, Kyoto, Japan
Gelapparatur	Mini Protean® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Infrarot-Scanner	Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Inkubatorschrank	B6060	Hereaeus, Hanau
Inkubatorschüttler	G25 Mutitron (mit Kühlung)	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA Infors Bottmingen, Schweiz
Kamera	Leica MZ 8 Binokular	Mikrovid GmbH, Arnsberg
LED Felder	CLF floraLED	CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA, Staufen
MALDI-TOF Massenspektrometer	MALDI-TOF-TOF Ultraflex II	Bruker Daltonik, Bremen
nano HPLC	nanoRSLC	Dionex/Thermo
Optometer	Gigahertz-Optik P-2000	Gigahertz-Optik GmbH, Türkenfeld
Pflanzenanzuchtskammer	Percival AR75L	CLF Plant Climatics GmbH, Wertingen
pH-Meter	CG825 pH-Meter	Schott, Wiesbaden

Geräte	Bezeichnung	Firma
Photometer	UV-2401 PC UV-VIS Recording Spectrophotometer	Shimadzu, Kyoto, Japan
	Nano Drop ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Langenselbold
Polytronmixer		Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Pipetten	SL-Pette XE®	Süd-Laborbedarf GmbH, Düsseldorf
Schüttler	Typ 3005	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Spannungs-/Stromquelle	Power 300 Electrophoresis Power Supply	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Speed Vac	Vacufuge™ Speed Vac Concentrator	Eppendorf, Hamburg Savant
Sterilbank	Aura H 130	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen
	KS 12	Thermo Scientific, Langenselbold
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex TK52 Sonorex Super 10P	Bandelin electronic, Berlin
UV-Transilluminator		Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY USA
Waagen	Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
	770 Analysewaage	Kern&Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellmühle	MM200	Retsch, Haan
Zentrifugen	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Labofuge 400R Function Line	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Beckman J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
	Centricon T-1080 (Ultrazentrifuge)	Kontron, Eching

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfreaktionsgefäße (Protein LoBind Microcentrifuge Tubes 0,5 ml und Eppendortubes 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Größenmarker

Bezeichnung	Firma
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Molekulargewichte [kDa]: 170, 130 95 72, 55, 43, 34, 26, 17)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Molekulargewichte [kDa]: 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra low range (Größen [bp]: 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Multiple Tag Protein ABIN963980, Größe 52 kD und trägt 16 häufige Affinitäts-tags (TrxMS, T7, HSV, c-Myc, VSV-g, Glu-Glu, V5, E-tag, Flag-tag, S-tag, HA, KT3, E2, Au1, Au5, 6xHis)	antibody-online Inc, Atlanta (USA)

2.1.5 Organismen

2.1.5.1 *Arabidopsis thaliana* Linien und Mutanten

Abkürzung	Bezeichnung	Herkunft	Hintergrund
Nossen	Wildtyp, Nossen (Ds6 - 393 - 19)	Riken BioResource Centers	-
Ler	Wildtyp, Landsberg erecta		-
Col	Wildtyp, Columbia (glabrous, ohne Trichome)	U. Höcker, Köln	-
<i>cry3</i>	<i>cry3</i> knock out Mutante über Transposoninsertion, Riken Linie 16-1606-1 (pst 20171)*	Riken BioResource Centers	Nossen
<i>cry3ox</i>	Überexpressionslinie von <i>cry3</i> (#6)*	Stefan Reisbacher, 2009	Ler
<i>CRY3</i> -RNAi	<i>CRY3</i> -RNAi Linie 15-7*	Stefan Reisbacher, 2009	Col
<i>cry1</i>	<i>cry1</i> -1, früher <i>hy4</i> -1, <i>hy4</i> -2.23N**	Koorneef <i>et al.</i> 1980, Ahmad & Cashmore, 1993	Ler

Abkürzung	Bezeichnung	Herkunft	Hintergrund
<i>cry1cry2</i> 1	<i>cry1-1 fha-1</i> , Nachzucht vom 11.06.08 ***	von Margaret Ahmad, Paris erhalten	Ler
<i>cry1cry2</i> 2	<i>cry1-1 fha-1</i> , Nachzucht vom 15.08.08 ***	von Margaret Ahmad, Paris erhalten	Ler
<i>cry3</i> -GFP	Überexpressionslinie von <i>cry3</i> -GFP	Julia Sommer, 2010	Ler
<i>cry3</i> -HA	Heterozygote Überexpressionslinie (35S) von <i>cry3</i> -HA mit vermutlich mehr als einer Insertion	diese Arbeit	<i>cry3</i>
<i>cry3</i> -HA/Nossen	Heterozygote Überexpressionslinie (35S) von <i>cry3</i> -HA mit vermutlich mehr als einer Insertion	diese Arbeit	Nossen
<i>cry3</i> -HA/Ler	Heterozygote Überexpressionslinie (35S) von <i>cry3</i> -HA mit vermutlich mehr als einer Insertion	diese Arbeit	Ler
<i>cry3</i> -HA/Col	Heterozygote Überexpressionslinie (35S) von <i>cry3</i> -HA mit vermutlich mehr als einer Insertion	diese Arbeit	Col
GB#12	T-DNA-Insertion im letzten CRY3 Exon (423F01)	GABI-Kat, NASC	Col

2.1.5.2 *E.Coli*

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL1 blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacIqZΔM15</i> , Tn10 (Tetr r)]	Stratagene
BNN132	<i>endA1 gyr96 hsdR17 supE44 relA1 delta(lac-roAB)</i> (F' <i>traD36 proA+ proB+ lacIq delta(lacZ)M15</i>) <i>lambdaKC(kan-cre)</i>	John Walker

2.1.5.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm	Genotyp	Transformationsmarker	Herkunft
GV3101 pMP90	Chromosomales (C58) Resistenzgen: Rifampicin Resistenzgen auf Ti-Plasmid (pMP90): Gentamycin	Rif, Gent	(Koncz <i>et al.</i> , 1992)

2.1.5.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Reporter	Transformation s-marker	Herkunft
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3 : : MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ	HIS3, ADE2, lacZ, Mel1	Trp1, leu2	Clontech
Y190	MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, HIS3, lacZ, trp1, leu2, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh ^r 2, LYS2 : : GAL1 _{UAS} -HIS3 _{TATA} -HIS3, URA3 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	His3, LacZ	Trp1, leu2, cyh ^r 2	Clontech

2.1.5.5 Phagen

Name	Beschreibung	Herkunft
λACT Library CD4-10	Yeast two-hybrid cDNA library im LAMBDA-ACT Vektor; hergestellt aus Nossen (No-0) <i>random-primed</i> mRNA	John Walker

2.1.6 Plasmide

Name	Funktion	Selektionsmarker	Herkunft
pFGC5941	Binärer Vektor, <i>A.tumefaciens</i> vermittelte Transformation von Pflanzenzellen	Kanamycin, BASTA [®]	ARABIDOPSIS BIOLOGICAL RESOURCE CENTER (ABRC)
pGEM-T	Zwischenvektor zur Klonierung und Sequenzierung	Ampicillin	Promega
pB7-ABARespro-mCherryNLS	Kernlokalisationskontrolle	Spectinomycin, BASTA [®]	Katharina Caesar
pGADT7	Hefeexpressionsvektor mit Fusion an Gal4 Aktivierungsdomäne und HA Tag	Ampicilin, Leucin	Clontech
pACT	Hefeexpressionsvektor mit Fusion an Gal4 Aktivierungsdomäne	Ampicilin, Leucin	Durfee <i>et al.</i> , 1993 (Durfee <i>et al.</i> , 1993)
pGBKT7	Hefeexpressionsvektor mit Fusion an Gal4 DNA-Bindedomäne und cMyc Tag	Kanamycin, Tryptophan	Clontech
p19 (pBIN61 P19)	P19 aus dem <i>tomato bushy stund</i> Virus unterdrückt das posttranskriptionelle <i>gene silencing</i>	Kanamycin	(Voinnet <i>et al.</i> , 2003)xxx

2.1.7 Primer und Oligos

Name	Sequenz (5' nach 3')	Funktion
pACT2-FP	GATGATGAAGATACCCAC	Y2H library screen
pACT2-RP	CAGTTGAAGTGAACCTTGC	Y2H library screen
Oligo#1(30.09.04)	CCATGGCGGCTTCCTCTCTCTCG	Klonierung CRY3 (5'Primer)
Oligo#2(30.09.04)	GGATCCTAAGGACCATTGTGTCTAGAAC	Klonierung CRY3 (3'Primer mit Stop Codon)
Oligo#1(27.07.11)	GGATCCATTGTGTCTAGAACGTCTCCC	Klonierung CRY3 (3'Primer ohne Stop Codon)
oligo#2(27.07.11) 54-mer	GATCTGCTGCCGCAGCGGCTGCTTATCCATACGATGT TCCAGATTATGCTTGAG	HA Epitop oligo mit 6 Ala 5': BglII site, 3' BamHI site. Forward
oligo#2(27.07.11) 54-mer	CTAGGAGTTCGTATTAGACCTTGTAGCATACCTATTCG TCGGCGACGCCGTCGT	HA Epitop oligo mit 6 Ala 5': BglII site, 3' BamHI site, mit Stop Codon. Reverse
oligo#4(27.07.11) 57-mer	GATCTGCTGCCGCAGCGGCTGCTGAGCAAAAGTTGA TTTCTGAGGAGGATCTTTGAG	myc Epitop oligo mit 6 Ala 5': BglII site, 3' BamHI site. Forward
oligo#4(27.07.11) 57-mer	CTAGGAGTTTCTAGGAGGAGTCTTTAGTTGAAAACGA GTCGTCGGCGACGCCGTCGT	myc Epitop oligo mit 6 Ala 5': BglII site, 3' BamHI site, mit Stop Condon. Reverse
HRM At-cry2 fha-1 F (#3 10.12.12)	TTTCCTGTCTTCATTTGGTGTCTCG	HRM zur SNP-Detektion
HRM At-cry2 fha-1 R (#4 10.12.12)	AAGGATTGAGATAAGTGAGCAAGTGATTG	HRM zur SNP-Detektion
CRY3 F	CAG CAT TCC CAA GCA AGC ACA AAA C	qRT PCR
CRY3 R	CCA GCA TTT GAC CCT CCA GCC ATT G	qRT PCR
Actin F	ACC CTG TTC TTC TTA CCG AGG CTC C	qRT PCR
Actin R	GAC ACA CCA TCA CCA GAA TCC AGC	qRT PCR

2.1.8 Antikörper

Wenn nicht anders vermerkt, handelt es sich um polyklonale Antikörper.

Bezeichnung	Immunogen	Wirt	Verdünnung für Western blot	Bezugsquelle
Anti-CAB	Chlorophyll a/b bindende Proteine aus <i>Sinapsis alba</i>	Maus	1:2000	Tim Kunkel, Universität Freiburg
Anti-c-myc	c-myc Epitope, monoklonaler Antikörper Klon 9E10	Maus	1:1000	Babco/Covance
Anti- cry3	rekombinantes cry3 Protein SA4288	Kaninchen	1:1000	Eurogentech
Anti-GFP	<i>green fluorescent protein</i> (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i> (fusioiniertes Volllängeprotein)	Ziege	1:1000 bis 1:30000	Rockland
Anti-GLN2	KLH konjugiertes synthetisches Peptid mit der katalytischen Region der glutamine synthetase/guanido kinase superfamily (AS08 296)	Kaninchen	1:5000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-HA <i>high affinity</i>	HA Epitop, monoklonaler Antikörper Klon 3f10	Ratte	1:2000	Roche
Anti-Lhcb1	BSA konjugiertes synthetisches Peptid aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Lhcb1.1, Lhcb1.2, Lhcb1.3, Lhcb1.4 und Lhcb1.5 (AS05 084)	Kaninchen	1:5000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-Lhcb2	BSA konjugiertes synthetisches Peptid aus stark konservierter Lhcb2 Sequenz, die auch in <i>Arabidopsis thaliana</i> Lhcb2.1 vorkommt (AS01 003)	Kaninchen	1:5000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-Pap1/PGL35	rekombinantes <i>A. thaliana</i> PGL35 (Pap1) At4g04020 (AS06 116)	Kaninchen	1:3000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-PRK	KHL-konjugiertes synthetisches Peptid aus bekannten Sequenzen der PRK (AS07 257), affinity purified serum	Kaninchen	1:1000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-RA1/RA2	aufgereinigte, rekombinante RuBisCO activase aus <i>Gossypium hirsutum</i> (Q9AXG1) (AS10 700)	Kaninchen	1:5000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-RuBisCO	KLH-konjugiertes synthetisches Peptid, welches in allen bekannten RuBisCO-Proteinsequenzen konserviert ist	Hase	1:5000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti-SHMT	Aufgereinigte Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) aus <i>Spinacia oleracea</i>	Hase	1:5000	Agrisera (Vännäs, Schweden)
Anti- α -Tubulin	C-Terminus der α Tubulin Isoform	Maus	1:2000	Sigma Aldrich gmbH, Steinheim
IRDye® 800CW Donkey Anti-Mouse IgG	Immunoglobulin G von Mäusen, gesamtes Molekül	Esel	1:10000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
IRDye® 800CW Donkey Anti-Goat IgG	ImmunoglobulinG von Ziegen	Esel	1:10000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)

Bezeichnung	Immunogen	Wirt	Verdünnung für <i>Western blot</i>	Bezugsquelle
IRDye®800CW Goat anti-rat IgG	Immunoglobulin G von Ratten, gesamtes Molekül	Ziege	1:10000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
IRDye®680 Donkey Anti Mouse IgG	Immunoglobulin G von Mäusen, gesamtes Molekül	Esel	1:10000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
IRDye® 680 Donkey Anti- Rabbit IgG	Immunoglobulin G von Hasen, gesamtes Molekül	Esel	1:10000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
IRDye®680 Goat anti-rat IgG	Immunoglobulin G von Ratten, gesamtes Molekül	Ziege	1:10000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Rabbit anti- goat IgG HRP conjugated	aufgereinigtes Ziegen IgG, gesamtes Molekül (AS09 605)	Kaninchen	1:10000	Agrisera
Goat anti Rabbit HRP conjugated	IgG von Kaninchen, gesamtes Molekül	Ziege	1:10000	Sigma Aldrich gmbH, Steinheim
Goat anti rat HRP conjugated	IgG von Ratten, gesamtes Molekül	Ziege	1:10000	Sigma Aldrich gmbH, Steinheim

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 Sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte auf ½ Murashige & Skoog (MS) - Platten, zur Herstellung dieser wurde portioniertes MS-Basalmedium von Duchefa Biochemie (Harleem, Niederlande) verwendet. Die 4,3 g MS-Basalmedium und 1 g MES wurden in 1,8 l H₂O_{dest.} gelöst und der pH mit KOH auf 5,7 eingestellt. Anschließend wurden 18 g Phytoagar zugegeben und der Ansatz mit H₂O_{dest.} auf 2 l aufgefüllt und autoklaviert. Das sterile Medium wurde unter einer Sterilbank in Petrischalen (Sarstedt) gefüllt, wobei jede Schale etwa 30 ml enthielt. Nach dem Erkalten und Verfestigen des Agars wurden die ½ MS-Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Die gewünschte Menge *Arabidopsis thaliana* Samen wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen eingewogen und für 2 min unter ständigem Vortexen mit 70%igen EtOH inkubiert. Die Samen wurden durch Zentrifugation (10600xg, 1 min) pelletiert und der Alkohol abgenommen. Die Sterilisationslösung wurde zugegeben und die Samen mit dieser für 15 min inkubiert. Um eine gleichmäßige Durchmischung sicher zu stellen wurden die Gefäße alle 2 min invertiert. Die Samen wurden wie beschrieben pelletiert und insgesamt 5mal mit je 1 ml H₂O_{dest.} gewaschen. Anschließend wurden die Samen in 0,15% Phytoagar aufgenommen und durch Auftropfen auf den ½ MS-Platten verteilt. Nach dem Antrocknen der Agarlösung wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und die Stratifikation der Samen erfolgte für 2 bis 4 Tage im Dunkeln bei 4°C.

Lösungen	Zusammensetzung
Sterilisationslösung	25% (v/v) NaOHCl, 0,05% (v/v) Tween
70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol (technischer)
0,15% Phytoagarlösung	0,15% (w/v) Phytoagar (durch Autoklavieren sterilisiert)

2.2.2 Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana* Keimlingen

Mit *Arabidopsis thaliana* Keimlingen wurden hauptsächlich Untersuchungen durchgeführt, die einen Einfluss von cry3 auf die lichtabhängige Deetiolierung analysieren sollten. Abhängig davon, ob die Hypokotyllängen gemessen oder spezifische Proteine nachgewiesen werden sollten, wurden angepasste Protokolle für die Anzucht verwendet.

2.2.2.1 Anzucht für die Hypokotyllängenmessung

Die Keimung der sterilen, stratifizierten Samen (siehe 2.2.1) wurde durch eine 4stündige Bestrahlung mit Weißlicht induziert. Direkt im Anschluss wurden die Platten den verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt oder im Dunkeln inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte in LED Kammern

mit Blau-, Rot- bzw. dunkelrotem Licht der Wellenlängen 471 nm, 660 nm und 748 nm. Die gewünschte Lichtintensität wurde mit Hilfe des Optometers eingestellt, zur Einstellung der Fluenzraten wurden neben dem Bedienelement der LED-Kammern Graustufenfilter verwendet. Die Bestrahlung erfolgte stets über einen Zeitraum von 96 h.

Um die Hypokotyllängen zu bestimmen wurden 20 Keimlinge auf schwarze Pappe transferiert und zusammen mit einem Längenstandard unter Verwendung des Programms Motic Images Plus 2.0 der Firma Motic (Wetzlar, Deutschland) fotografiert. Zur Vermessung wurde das Programm Image J (Schneider *et al.*, 2012) verwendet und die Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel 2003 bzw. 2007 und ggf. mit OriginPro® 8G ausgewertet.

2.2.2.2 Anzucht zum Nachweis spezifischer Proteine während der Deetiolierung

Sollte das Verhalten von spezifischen Proteinen oder mRNAs im Verlauf der lichtabhängigen Deetiolierung genauer betrachtet werden musste die Anzucht verändert werden. Zur Isolation von Proteinen und Nukleinsäuren wird eine gewisse Menge Ausgangsmaterial benötigt. Um dies zu erreichen wurden die Keimlinge zunächst etioliert angezogen (96 h in Dunkelheit), bevor sie den jeweils angegebenen Lichtprogrammen ausgesetzt wurden. Die dadurch eingeleitete Deetiolierung der Keimlinge wurde typischerweise über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht und in definierten Zeitabständen Proben genommen. Das Pflanzenmaterial wurde unter schwachem Grünlicht geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor es weiter verarbeitet wurde. Siehe dazu 2.4.1.4.

2.2.3 Pflanzenanzucht auf Erde

Eine Mischung aus 2/3 Erde und 1/3 Vermiculit wurde für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* verwendet. Um einen übermäßigen Befall mit Pilzen und anderen Schädlingen vorzubeugen wurde die Erde autoklaviert, bevor sie gut gewässert in die Pflanztöpfe verteilt wurde. Zur Anzucht von Tabak wurden dabei ausschließlich Tontöpfe verwendet. Da Tabaksamen keine Stratifikation benötigen um zu keimen, wurden diese direkt auf der Erde verteilt und in die Anzuchtkammer (Phytokammer) mit Langtagbedingungen (16 h Weißlicht, 8 h dunkel) überführt. Die Stratifikation der *Arabidopsis thaliana* Samen erfolgte nach der Aussaat auf Erde im Dunkeln bei 4°C für 2 bis 4 Tage. Je nach Bedarf erfolgte die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter Lang- oder Kurztagbedingungen (16 h dunkel, 8 h Licht) in der Phytokammer oder Anzuchtschränken (Percival AR75L). Die Bewässerung erfolgte alle 2 bis 3 Tage von unten indem die Schalen, in denen sich die Pflanztöpfe befanden, bis zu einer Höhe von 0,5 bis 1,5 cm mit Leitungswasser befüllt wurden.

2.2.4 Chlorophyllmengenbestimmung

Zur Extraktion von Chlorophyll aus Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurde dieses eingewogen und mit Methanol sowie einer Spatelspitze Magnesiumhydroxidcarbonat aufgekocht. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis die Pflanzen komplett entfärbt waren, mindestens aber dreimal. Die Methanolmenge wurde mit einem Messzylinder bzw. bei kleineren Mengen durch pipettieren bestimmt. Die Messung von Chlorophyll a und b erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Absorptionen bei 652 nm und 665,2 nm. Außerdem wurde die Trübung der Lösung durch Messung bei 750 nm bestimmt und von den jeweiligen Chlorophyllabsorptionen abgezogen. Die Menge an Chlorophyll in den Extrakten wurde nach folgender Formel bestimmt (Porra *et al.*, 1989):

$$\text{Gesamtchlorophyll} = 22,12 \times A_{652} + 2,71 \times A_{665,2} \text{ (}\mu\text{g/ml Extrakt)}$$

$$\text{Chlorophyll a} = 16,29 \times A_{665,2} - 8,54 \times A_{652} \text{ (}\mu\text{g/ml Extrakt)}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 30,66 \times A_{652} - 13,58 \times A_{665,2} \text{ (}\mu\text{g/ml Extrakt)}$$

Die Chlorophyllmenge wurde schließlich in Bezug zum Frischgewicht angegeben. Sollte die Chlorophyllmenge hingegen in einem löslichen Proteinextrakt bestimmt werden wurde dieser stark mit Methanol verdünnt und die Menge des Blattfarbstoffs wie beschrieben bestimmt. Als Bezugsgröße diente dabei nicht das Frischgewicht, sondern die Proteinmenge des Extrakts die mittels Bradford bestimmt wurde (siehe 2.4.2.2).

2.2.5 Mikroskopie

Das Fluoreszenz-Mikroskop Bx51 von Olympus und das konfokale Laserscan-Mikroskop kurz KLSM (ein Leica TCS SP2 auf einem Leica DM RE Stativ) wurden verwendet. Die entsprechenden Anregungs- und Detektionswellenlängen sind im Text angegeben.

2.2.6 Transiente Transformation von *Arabidopsis thaliana* Zellkultur

Die Zellkultur wurde aus Mesophyllzellen (Gabe von Aidyn Mouradov und Csaba Koncz, als grüne Zellkultur bezeichnet) und Wurzelzellen (Gabe von Csaba Koncz, als weiße Zellkultur bezeichnet) hergestellt. Das Material stammte vom Ecotyp *Landsberg erecta* und das verwendete Protokoll ist an das von Altman *et al.* angelehnt (Altmann *et al.*, 1992).

2.2.6.1 Protoplastierung von *Arabidopsis thaliana* Blattmaterial und Keimlingen

Die Protoplastierung wurde im Wesentlichen durchgeführt wie von Yoo *et al.* beschrieben (Yoo *et al.*, 2007). Blattmaterial oder Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* wurden mit einem Skalpell in feine Streifen bzw. kleine Stücke zerteilt und direkt in den Verdau-Puffer gegeben. Der Puffer wurde dabei stets frisch angesetzt und durch Filtration sterilisiert. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für mindestens 3,5 Stunden bei RT und 50 rpm. Direkt im Anschluss konnten die Protoplasten mikroskopisch untersucht werden.

Lösungen	Zusammensetzung
Verdau-Puffer	20 mM MES, 1,5% (w/v) Cellulose, 0,4% (w/v) Macerozyme, 0,4 M Mannitol, 20 mM KCl, sterilfiltriert

2.2.6.2 Protoplastierung von Zellkultur

Für eine optimale Transformationsrate wurde Zellkultur etwa 3 bis 4 Tage nach der letzten Umsetzung in neues Medium verwendet. Etwa 50 ml Zellkultur wurden pelletiert (5 min, 60xg). Der Überstand verworfen und das Pellet in 35 ml Enzymlösung resuspendiert. In drei Petrischalen wurden je 12 ml Protoplasten-Suspension gefüllt und diese mit Parafilm verschlossen. Der Verdau der Zellwände fand über Nacht statt, dafür wurden die Petrischalen 17 Stunden bei 24°C und 25 rpm inkubiert.

Lösungen	Zusammensetzung
Enzymlösung	1,2 % (w/v) Cellulase „Onozuka“ R-10 (Serva), 0,25 % Macerocym R-10 (Serva) in 8 mM CaCl ₂ und 0.4 M Mannitol-Lösung lösen; der pH mit KOH auf pH 5.5 bis 5.8; sterilfiltriert

2.2.6.3 Reinigung und Bestimmung der Zellzahl

Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 60xg) aus 50 ml Suspension pelletiert. Das Pellet wurde mit 5 ml W5 gewaschen (5 min, 60xg). Anschließend wurde das Pellet in 10 ml W5 resuspendiert und 30 Minuten bis 2 Stunden auf Eis gelagert. Die Qualität der Protoplasten wurde lichtmikroskopisch überprüft und die Zellzahl mit einer Thoma Zählkammer bestimmt.

Lösungen	Zusammensetzung
W5	150 mM NaCl, 125 mM CaCl ₂ , 5 mM KCl, 5 mM Glucose, pH 5.8 mit KOH; sterilfiltriert oder autoklaviert

2.2.6.4 Transformation der Protoplasten

Die Protoplasten wurden erneut pelletiert (5 min, 6xg) und die Zellzahl mit MaMg auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die zur Transformation verwendete DNA sollte eine Konzentration von etwa 1 mg/ml haben. In 15 ml Gefäßen (Falcon) wurden 20 bis 50 µg Plasmid-DNA gegeben und mit 50 µg

Carrier DNA vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert bevor 300 µl PEG-CMS-Lösung zugegeben wurden (die Konzentration von PEG betrug im Ansatz damit 20%), anschließend wurde für 30 min bei RT inkubiert. Um das PEG zu entfernen wurden 8 ml W5 langsam über einen Zeitraum von 10 min zu der Suspension gegeben und durch vorsichtiges schütteln gemischt, bevor die Protoplasten durch Zentrifugation (5 min, 60xg) pelletiert wurden. Das Pellet wurde in 4,5 ml 0,5 M Mannitol und 0,5 ml W5 vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 60xg). Das Pellet wurde in 12 ml B5-medium mit Glucose resuspendiert und in eine Petrischale überführt die mit Parafilm verschlossen wurde. Die transformierten Protoplasten wurden über Nacht bei 25°C im Dunkeln inkubiert und am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Lösungen	Zusammensetzung
Carrier DNA	DNA aus Lachs-Sperma 10 mg/ml (Clontech)
MaMg	15 mM MgCl ₂ , 0,5 M Mannitol, 5 mM MES, mit KOH auf pH 5.6, sterilfiltriert oder autoklaviert
PEG-CMS	40% w/w PEG 6000 (Merck) gelöst in 0,4 M Mannitol, 0,1 M Ca(NO ₃) ₂ , pH 7-9, sterilfiltriert, in 2 ml-Aliquots abgefüllt und bei -20 °C gelagert
B5-Medium mit Glukose	Gamborgs B5-Medium mit 72,6 g/l Glucose, pH 5.8

2.2.7 Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens ist ein Bodenbakterium, welches in der Lage ist durch die Übertragung eines spezifischen DNA Abschnitts (T-DNA) das Wachstum von Tumoren (Wurzelhalsgallen) in Pflanzengewebe auszulösen. Diese T-DNA ist auf einem tumorinduzierenden (Ti) Plasmid lokalisiert. Die Fähigkeit von *A. tumefaciens*, DNA in Wirtszellen zu transferieren, macht man sich bei der Transformation von Pflanzenzellen zu Nutze. In der Regel wird dabei ein so genanntes binäres System verwendet. Binär bezeichnet dabei, dass *A. tumefaciens* neben seinem Chromosom zwei weitere Plasmide enthält: das Ti-Plasmid ohne die ursprüngliche T-DNA, aber mit der Virulenzregion und das Ti-Plasmid mit der T-DNA. Die Virulenzregion des Ti-Plasmids besteht aus einer Vielzahl von Virulenzgenen (*vir* Gene), die für die Übertragung der T-DNA in die Wirtszelle essentiell sind. Die Expression dieser *vir* Gene wird durch phenolische Substanzen wie Acetosyringon induziert, die von Pflanzen auf Grund einer Verletzung abgegeben werden. Der binäre Vektor enthält die T-DNA die von Border-Sequenzen umschlossen ist. Jegliche DNA, die sich zwischen diesen Border-Sequenzen befindet, wird durch das Zusammenspiel der *vir* Gene in die Wirtszelle übertragen und dort zufällig in das Wirtsgenom integriert. Es ist somit möglich, zu untersuchende Gene in die T-DNA Region des binären Plasmids zu klonieren und anschließend durch *A. tumefaciens* vermittelt in das pflanzliche Genom zu integrieren (Michielse *et al.*, 2008).

2.2.7.1 Anzucht und Lagerung

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte bei 28°C bis 30°C in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika, typischer Weise für 48 h, flüssig-Medium wurde dabei bei etwa 200 rpm geschüttelt. Zur kurzfristigen Lagerung wurden *A. tumefaciens* Kulturen auf YEB-Platten ausgestrichen (vereinzelt), für 48 h angezogen bis deutliche Einzelkolonien sichtbar waren und anschließend für bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert. Für eine langfristige Lagerung wurden 930 µl einer *A. tumefaciens* flüssig-Kultur mit 70 µl DMSO versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Lösungen	Zusammensetzung
EB	0,5% (w/v) Rinderextrakt, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,03% (w/v) MgSO ₄ , durch autoklavieren sterilisiert
YEB-Platten	YEB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar, durch autoklavieren sterilisiert

2.2.7.2 Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 2x20 ml YEB (mit entsprechenden Antibiotika) mit einer Einzelkolonie des gewünschten Stammes angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht (ca. 16 h) bei 28°C inkubiert, anschließend wurde eine OD₆₀₀ von 0,1 in 500 ml YEB (mit Antibiotika) eingestellt. Die Zellen wuchsen bei 28°C weiter bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht war, somit wurde sichergestellt, dass sich die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Durch Zentrifugation (10 min, 4000xg, RT) wurden die Zellen pelletiert und vorsichtig in 100 ml NaCl₂ resuspendiert, um anschließend erneut zentrifugiert (10 min, 4000xg, RT) zu werden. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem (4°C) CaCl₂ aufgenommen und 100 µl Aliquots der Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -70°C.

Lösungen	Zusammensetzung
YEB	0,5% (w/v) Rinderextrakt, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,03% (w/v) MgSO ₄ , durch autoklavieren sterilisiert
NaCl ₂	0,15 M NaCl ₂
CaCl ₂	20 mM CaCl ₂

2.2.7.3 Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien

Die chemisch kompetenten Zellen wurden stets auf Eis aufgetaut, pro zu transformierendem Konstrukt wurde dabei ein Aliquot (100 µl) verwendet. Zu den Zellen wurden 5 µl Plasmid-DNA einer Maxi-Prep (mit dem Qiagen Plasmid Prep Maxi Kit von Qiagen, Hilden) gegeben, dies entspricht etwa 2,5 µg bis 10 µg DNA. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert, bevor er für weitere 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Es folgte ein 5minütiger Hitzeschock bei 37°C bevor 1 ml YEB zugegeben wurde. Der Transformationsansatz wurde für 4 h bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (3 min, 1500xg, RT), in einem kleinen Volumen YEB resuspendiert, auf YEB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und diese für 48 h bei 28-30°C inkubiert.

Lösungen	Zusammensetzung
YEB	0,5% (w/v) Rinderextrakt, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,03% (w/v) MgSO ₄ , durch autoklavieren sterilisiert
YEB-Platten	YEB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar, durch autoklavieren sterilisiert

2.2.7.4 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Die Blätter von etwa 4 bis 6 Wochen altem Tabak eignen sich besonders gut zur transienten Transformation mit Agrobakterien durch Infiltration. Am Vortag der Transformation wurde eine Über-Nacht-Kultur der entsprechenden Stämme in 3 ml YEB mit halber Antibiotika Konzentration angesetzt. Am nächsten Tag wurden 1 bis 2 ml dieser Kulturen in 4 ml YEB aufgenommen, wobei dieser Ansatz die volle Antibiotika Konzentration enthielt und für weitere 4 h inkubiert.

Während dieser Zeit wurden die Tabakpflanzen gründlich gewässert und mit einer lichtdurchlässigen Haube bedeckt. Das so entstehende feucht-warme Klima unterstützte die Öffnung der Stomata an der Blattunterseite der Tabakblätter, was wiederum die spätere Infiltration erleichterte.

Nach 4 stündiger Inkubation wurden die Agrobakterien durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 3000xg, 4°C). Das Pellet wurde in kaltes (4°C) Infiltrationsmedium aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 eingestellt. Sollten mehrere Konstrukte gleichzeitig in Tabak transformiert werden wurden dieser immer im gleichen Verhältnis gemischt. Allen Transformationen wurden stets Agrobakterien die das P19 Plasmid tragen beigefügt. Das Protein p19 aus dem TBSV (*tomato bushy stunt virus*) unterdrückt das posttranskriptionelle *gene silencing* im transformierten Gewebe (Voinnet *et al.*, 2003). Für jede Pflanze die transformiert werden sollte wurden 2 ml der entsprechenden Agrobakteriensuspensionen gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Suspension mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze (ohne Kanüle) durch die geöffneten Stomata an der Blattunterseite in die Blätter injiziert werden. Dieser Vorgang wird auch als Infiltration

bezeichnet. Nach zwei bis vier Tagen wurde die Expression der gewünschten Proteine fluoreszenzmikroskopisch beobachtet oder mittels *Western blot* untersucht.

Lösungen	Zusammensetzung
YEB	0,5% (w/v) Rinderextrakt, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,03% (w/v) MgSO_4 , durch autoklavieren sterilisiert
Infiltrationsmedium	10 mM MgCl_2 , 10 mM MES-KOH Puffer pH 5,6, 150 μM Acetosyringon

2.2.7.5 Floral Dip

Eine Besonderheit in der Blütenbildung von *Arabidopsis thaliana* macht es möglich den weiblichen Gametophyten direkt zu transformieren indem die noch geschlossenen Blüten mit einer Agrobakteriensuspension benetzt werden (Clough und Bent, 1998). Nach Öffnung der Blüten kommt es zu einer Selbstung der Pflanzen, weshalb die Transformanten stets heterozygot für das entsprechende, inserierte Merkmal sind. Benötigt werden folglich Pflanzen, die viele geschlossene Blüten tragen. Dies ist besonders gut zu erzielen indem die Pflanzen zunächst unter Kurztag (16 h Dunkel, 8 h Licht) angezogen werden und zur Blühinduktion in Langtag (16 h Licht, 8 h Dunkel) verlegt werden. Es können jedoch auch Pflanzen verwendet werden die komplett unter Langtagbedingungen gewachsen sind. Offene Blüten und Samenschoten wurden vor der Benetzung mit Agrobakterien entfernt, da diese nicht mehr transformiert werden können.

Zur Anzucht der Agrobakterien wurde zunächst eine Übernachtskultur (4 ml) in YEB mit halber Antibiotikakonzentration aus DMSO Dauerkulturen oder einer Einzelkolonie von YEB-Platten angeimpft. Am nächsten Morgen wurden mit dieser Kultur 500 ml YEB mit voller Antibiotika inokuliert. Das Wachstum erfolgte für 24 h bis 48 h Stunden, bis mindestens eine OD_{600} von 2 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5500xg, 20 min, RT) pelletiert, vorsichtig in Inokulationsmedium resuspendiert und eine OD_{600} von 0,8 eingestellt. Neben Saccharose enthält das Medium Silwet L-77, ein Detergenz welches die Oberflächenspannung von Wasser stark verringert und für eine effektive Transformation entscheidend ist. Die Infloreszenzen der zu transformierenden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden in die Agrobakteriensuspension getaucht, durch leichtes schwenken für ca. 10 Sekunden wurde eine gleichmäßige Benetzung sichergestellt. Anschließend wurden die Pflanzen in eine hohe Schüssel gestellt, die mit Frischhaltefolie mit dünnem, weißem Filterpapier bedeckt und auf den Boden der Pflanzenanzuchtkammer gestellt wurde. Somit wurde ein feuchtwarmes Klima und schwache Beleuchtung sichergestellt. Nach 24 h konnte die Abdeckung entfernt werden und die Pflanzen wuchsen unter Langtagbedingungen weiter bis schließlich die Samen geerntet werden konnten.

Als Selektionsmarker enthielten alle hier transferierten Konstrukte das *bar* Gen, welches eine BASTA Resistenz vermittelt. Um auf diese zu Selektionieren wurde das aus der Transformation enthaltene

Saatgut sehr dicht auf Erde ausgesät. Sobald die Keimlinge beide Keimblätter entfaltet hatten wurden sie mit der BASTA Lösung besprüht. Die Behandlung wurde insgesamt dreimal mit einem Abstand von je zwei Tagen durchgeführt, um sicher zu gehen, dass alle Pflanzen mit dem Herbizid benetzt wurden. Pflanzen die das Transgen nicht tragen sterben nach kurzer Zeit, während die positiven Transformanten überleben und weiterverwendet werden.

Lösungen	Zusammensetzung
YEB	0,5% (w/v) Rinderextrakt, 0,1% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,03% (w/v) MgSO_4 , durch autoklavieren sterilisiert
YEB-Platten	YEB-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar, durch autoklavieren sterilisiert
Inokulationsmedium	5% Saccharose, 0,05% Silwet L-77
BASTA Lösung	24 $\mu\text{g/ml}$ BASTA

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Klonierungsstrategien

2.3.1.1 CRY3:HA und CRY3:cMyc

Um CRY3 mit 6xAla-HA bzw. 6x-Ala-cMyc Tag zu fusionieren wurde zunächst CRY3 mittels PCR aus dem Vektor pQE-60/PHR3 (pQE-60/CRY3) vom 16.05.02 amplifiziert. Als Primer wurde Oligo#1(30.09.04) und Oligo#1(27.07.11) verwendet. Durch den 3'Primer wird eine Schnittstelle für BamHI an das Ende von CRY3 angefügt und durch den 5'Primer eine für NcoI an den Anfang. Das PCR Produkt (1707 bp) wurde in pGEMT ligiert.

Der Plasmid pGEMT/CRY3 wurde mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert um eine Religierung zu verhindern. Die Oligos welche die Sequenz für HA (Oligo#1 und Oligo#2 vom 27.07.11) bzw. cMyc (Oligo#3 und Oligo#4 vom 27.07.11) tragen wurden hybridisiert und einzeln in die BamHI Schnittstelle ligiert. Die Oligos tragen 5' eine BglIII Schnittstelle und 3' die BamHI Schnittstelle. Die generierten Überhänge der beiden Enzyme sind kompatibel und konnten somit ligiert werden. Dieses Vorgehen ermöglichte danach das ausschneiden von CRY3:HA bzw. CRY3:cMyc mit NcoI und BamHI und einfügen in den TI-Plasmid pFGC5941. Der TI-Plasmid wurde zunächst ebenfalls mit NcoI und BamHI geschnitten und über ein Agarose-Gel aufgetrennt, die größere Bande (Vektor ohne Chalconsynthase A Insert) wurde aufgereinigt und mit CRY3:HA bzw. CRY3:cMyc ligiert. Die Arbeiten wurden zum größten Teil von Elvira Happel durchgeführt.

2.3.1.2 cry3 in pGBKT7

Um CRY3 in einen Vektor für den *Y2H screen* zu klonieren, in dem es mit der Gal4-DNA-Bindedomäne und einem cMyc-tag fusioniert ist, wurden pFGC5941/CRY3 und pGBKT7 mit NcoI und BamHI verdaut. Das Produkt wurde über ein Agarose-Gel aufgetrennt und die Banden, dessen Größen CRY3 bzw. dem geöffneten Vektor pGBKT7 entsprechen, wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und ligiert. Der Erfolg wurde durch eine Testrestriktion und Sequenzierung überprüft. Alle Arbeiten wurden von Jeanette Schermuly durchgeführt.

2.3.2 DNA Extraktion aus Pflanzen

Die DNA Extraktion aus kleinen Mengen grünem Blattmaterial wurde im Wesentlichen wie von Edwards beschrieben durchgeführt (Edwards, Johnstone und Thompson, 1991). Ein Blatt wurde mit einem Pistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerkleinert. 400 µl der Edwards Lösung wurden

zugegeben und vermengt. Das Pistill wurde entnommen und das zerkleinerte Material für 5 min bei 20000xg und RT zentrifugiert. Der klare, grüne Überstand konnte direkt in eine PCR eingesetzt werden. Für eine Anreicherung der DNA und eine bessere Qualität wurde diese aus der Lösung gefällt. Dafür wurden 300 µl des Überstands mit 300 µl Isopropanol gemischt. Durch Zentrifugation bei 20000xg und RT für 5 min wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und anschließend für etwa 10 min bei RT trocknen gelassen. Das Pellet wurde in 60 µl TE resuspendiert.

Lösungen	Zusammensetzung
Edwards Lösung	200 mM Tris HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS
TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die gewünschte Menge Agarose (typischerweise 0,8 bis 3%) wurde in einem Erlenmeyerkolben mit TBE vermengt und in der Mikrowelle erhitzt bis die Lösung klar war. Als Farbstoff wurde *midori green* (Biozym) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und auf etwa 60°C abgekühlt bevor der Schlitten luftblasenfrei gefüllt und die Kämme hinein gesteckt wurden.

Die Proben wurden mit 5x Probenpuffer vermischt und in die Taschen des erkalteten Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 bis 120 Volt, abhängig von der Agarose Konzentration. Durch den Farbstoff *midori green* konnten die Nukleinsäuren anschließend auf einem UV-Tisch visualisiert und bei Bedarf fotografiert werden. Als Größenstandard wurden die jeweils vermerkten DNA Marker verwendet.

Lösungen	Zusammensetzung
TBE-Puffer	10,8 g/l Tris, 5,5 g/l Borsäure, 4 ml/l, 0,5 M EDTA mit NaOH auf pH 8,0
TBE-Agarose-Gel	1-3% (w/v) Agarose in TBE-Puffer erhitzt, anschließend Midori Green Advance (Biozym) zugegeben (8 ml pro 120 ml)
5x Probenpuffer	1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin

2.3.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur denaturierenden Auftrennung von Nukleinsäuren wurde ein 10% Polyacrylamid-Gel mit 7 M Harnstoff hergestellt. Verwendet wurde die Mini Protean® Gelapparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)(zur Verwendung siehe auch 2.4.3). Für ein Gel wurden 4,2 g Harnstoff in 6 ml H₂O_{dest.} bei etwa 60°C gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 0,24 ml H₂O_{dest.}, 1 ml 10XTBE und 2,65 ml Rotiphorese Gel40 (Carl Roth) zugegeben und mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer gemischt. 1 ml der Lösung wurde abgenommen und mit 10 ml APS und 2 µl Temed versetzt um ein Abdichtgel herzustellen. Diese schnell polymerisierende Mischung wurde zügig zwischen die

Glasplatten pipettiert und verhindert ein Auslaufen des eigentlichen Polyacrylamid-Gel. Nach Polymerisation des Abdichtgels wurde die restliche Polyacrylamid-Mischung mit 100 µl APS und 10 µl Temed versetzt, gemischt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Ein Kamm wurde eingesetzt und gewartet bis das Gel polymerisiert war.

Bei den zu untersuchenden Proben handelte es sich um Proben (Eluate, *input* und ungebundene Proteine) aus einer CoIP (siehe 2.4.9.5). 7,5 µl Probe wurde mit 7,5 µl *2xLoading dye* vermischt. Außerdem 5 µl des RNA Markers bzw. der 2-Log DNA *ladder* wurden mit jeweils 2,5 µl Nuklease freiem Wasser und 5 µl *2xLoading Dye* versetzt. Proben und Marker wurden für 10 min auf 70°C erhitzt und das Harnstoff-Polyacrylamid-Gel in die Mini Protean® Gelkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet und die Taschen damit ausgespült, bevor die Proben und Marker geladen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V, um kleine Nukleinsäure-Moleküle nicht zu verlieren wurden die gefärbte Lauffront nur zu etwa einem Viertel des Gels laufen lassen.

Lösungen	Zusammensetzung
10xTBE-Puffer	108 g/ml Tris, 55 g/l Borsäure, 40 ml/l, 5 M EDTA mit NaOH auf pH 8,0
<i>2x Loading Dye</i>	2x RNA Loading Fermentas (95% Formamid, 0,025% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylene Cyanol FF, 0,025% Ethidiumbromid, 0,5 mM EDTA)
RNA Marker	Riboruler <i>high range</i> , Fermentas
2-Log	2-Log DNA Ladder NEB

2.3.5 Genexpressionsanalyse mittels *real time* PCR

Um zu untersuchen, ob die Expression von *CRY3* in verschiedenen Photorezeptormutanten unterschiedlich auf verschiedene Belichtungen reagiert wurde zunächst RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription (RT)) und die Menge mittels *real time* PCR bestimmt. Als probeninterne Referenz wurde dabei Actin verwendet, welches als *house keeping gen* gilt, da es in der Zelle in weitgehend konstanter Menge vorliegt. Abgekürzt wird diese Methode auch als RT-qPCR bezeichnet und wurde von den Studenten Felix Hamann, Heval Atas und Alexander Schabasian durchgeführt und ist detailliert in der Bachelorarbeit von auch Felix Hamann beschrieben (Hamann, 2014). Die wichtigsten Punkte sind im Folgenden zusammen gefasst.

2.3.5.1 Pflanzenanzucht und Belichtung

Die Sterilisation der *A. thaliana* Samen erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben, ausgesät wurde in Petrischalen auf einen Rundfilter über zwei Lagen *Whatmann paper*, beides war zuvor mit Leitungswasser getränkt worden. Die Stratifikation erfolgte für 3 Tage bei 4°C im Dunkeln. Die Keiminduktion erfolgte durch eine 3 Stündige Belichtung mit Weißlicht (ca. 300 µmol m⁻² s⁻¹) bei RT,

gefolgt von einer 3tägigen etiolierten Wachstumsphase im Dunkeln bei RT. Anschließend wurden die Keimlinge mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge und Intensität belichtet (siehe Angaben im Text und Bildunterschrift). Dunkelproben wurden analog mitgeführt und geerntet, nur dass die Petrischalen lichtdicht verschlossen waren. Die Keimlinge wurden mit einem Skalpell vorsichtig von dem Rundfilter gekratzt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.3.5.2 RNA Extraktion und DNase Behandlung

Die RNA Extraktion erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* von Qiagen. Noch tiefgefroren wurden die Keimlinge mit zwei Stahlkugeln in der Schwingbechermühle zu Pulver zermahlen, dafür waren drei Durchgänge mit jeweils 30 Sekunden bei 30 Hz nötig. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt. Zu den aufgeschlossenen Keimlingen wurde 450 µl RLT Puffer (mit β-Mercaptoethanol) gegeben und gevortext bevor der Ansatz auf die *Shreddsäule* von Qiagen geladen wurde. Zur Extraktion wurde genau den Anweisungen des Herstellers gefolgt und die RNA durch Zugabe von zweimal 15 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde durch eine Messung am Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) überprüft.

Zur Entfernung verbleibender DNA wurde das *Precision DNase Kit* von PrimerDesign verwendet. Dafür wurde 1 µg RNA in 17 µl Rnase freiem Wasser eingesetzt und mit 1,7 µl des 10x *precision DNase reaction buffer* und 1 µl *Precision DNase* gemischt. Die Proben wurden im Thermocycler für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend die DNase bei 55°C für 5 min inaktiviert.

2.3.5.3 Reverse Transkription und *real time* PCR

Zur reversen Traskription, bei der RNA in die komplementäre cDNA umgeschrieben wird, wurde das *Precision nanoScript reverse transcriton Kit* von PrimerDesign verwendet. 9 µl der DNase behandelten RNA wurde mit 1 µl *yellow RT primer* (PrimerDesign) gemischt, für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend in Eiswasser gekühlt. Die benötigten Komponenten für die reverse Transkription wurden nach Anweisung des Herstellers gemischt und zusammen mit den Proben in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 20 min bei 55°C inkubiert. Durch eine 15minütige Inkubation bei 75°C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert.

Für die *real time* PCR wurde 1 µl der cDNA mit jeweils 1 µl der *forward* und *reverse* Primer für *CRY3* bzw. *Actin* und der *SensiFAST SYBR No-ROX Mix* (2x) von Bioline in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. In dem *SensiFAST SYBR No-ROX Mix* ist unter anderem die Polymerase und der Farbstoff *SYBR® green* enthalten. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA wodurch seine

Fluoreszenz steigt, diese Steigerung der Fluoreszenz ist es was der *real time Cyclor* am Ende jeder Elongationsphase detektiert und womit Rückschlüsse auf die eingesetzte Menge cDNA möglich sind. Angegeben und Verglichen wird schlussendlich der CT-Wert, das ist der PCR-Zyklus in dem die Fluoreszenz in einer Probe einen vorher definierten Schwellenwert überschreitet. Je kleiner der CT-Wert, desto größer die cDNA Menge in der Ausgangsprobe. Der CT-Wert sollte zwischen 10 und 30 liegen, sonst wurde die Probe genauer überprüft und ggf. wiederholt.

Für die PCR wurde der RotorGene Q von Qiagen mit folgendem Programm verwendet:

Temperatur	Dauer	Wiederholung
95°C	3 min	1x
95°C	5 s	40x
60°C	10 s	
72°C	15 s	

Für die Berechnung der relativen Transkriptmenge von *CRY3* wurde eine Primer-Effizienz von 2 angenommen. Die Auswertung durch die Studenten erfolgte zunächst nach folgender Formel die, die relative Transkriptmenge *CRY3* als $2^{(ct \text{ Actin} - ct \text{ CRY3})}$ angibt, was auch als $2^{-\Delta CT}$ bezeichnet wird.

Die Auswertung aller zusammengefassten Daten erfolgte schließlich einheitlich nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Schmittgen und Livak (2008). Zunächst wurde hierbei der $2^{-\Delta CT}$ und daraus der Mittelwert bestimmt. Im nächsten Schritt wurde jede „Probe“ durch den Mittelwert der „Kontrolle“ geteilt, die Probe war hierbei die belichtete Probe und die Kontrolle der Dunkelwert. Dies ergab den $2^{-\Delta\Delta CT}$ Wert. Basierend hierauf wurden Standardabweichung und Standardfehler berechnet sowie ein t-Test durchgeführt.

2.3.6 Single nucleotid polymorphism Detektion mit hochauflösenden Schmelzkurven

Bei dem so genannten *single nucleotid polymorphism* (SNP) handelt es sich um den Austausch eines einzigen Nukleotids wie er zum Beispiel in vielen klassischen Mutanten aus *A. thaliana* vorkommt und zum Beispiel dazu führt, dass ein Stop-Codon generiert wird. Sollen mehrere solcher SNP Mutanten gekreuzt werden muss auf die Anwesenheit der Mutation oder auf die Abwesenheit des Transkripts bzw. Proteins getestet werden. Eine schnelle Variante die Mutation nachzuweisen ist die Detektion der SNP mittels hochauflösender Schmelzkurven (high resolution melting curve (HRM)).

Die DNA Extraktion aus *A. thaliana* Blattmaterial erfolgte, wie unter 2.3.2 beschrieben mit Fällung der DNA. Für die Bestimmung der hochauflösenden Schmelzkurven wurde das Qiagen Type-it HRM PCR Kit, genau nach Anweisung des Herstellers, in Verbindung mit dem Rotor-Gene Thermocycler (Qiagen) verwendet. Als Primer für die PCR wurden HRM At-cry2 fha-1 F und HRM At-cry2 fha-1 R (siehe auch 02.1.7) und folgendes Programm verwendet:

Temperatur	Dauer	Wiederholung
95°C	5 min	1x
95°C	10 s	40x
60°C	30 s	

Die HRM Schmelzkurven wurden anschließend von 65°C bis 95°C aufgenommen und folgende Einstellungen am Thermocycler getroffen: *rising by 0,1; wait for 90 s at first step; wait for 2 s at each step; optimise gain on max fluorescence 70.*

2.3.7 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Um mögliche Interaktionspartner von Cryptochrome 3 aus *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren wurde ein *Yeast two Hybrid* (Y2H) System verwendet, das im Wesentlichen dem MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 von Clontech entspricht. Das System basiert auf dem Gal4 Promotor und wird dazu verwendet Proteininteraktionen in *Saccharomyces cerevisiae in vivo* zu finden (Fields und Song, 1989). Cry3 wurde dafür als *bait* verwendet und als c-terminale Fusion mit der Gal4 DNA-Binde-Domäne (BD) in dem Hefestamm AH109 exprimiert. Um einen Interaktionspartner zu identifizieren wurden diese Zellen mit einer cDNA *library* transformiert (CD4-10, von John Walker dem Arabidopsis Biological Resource Center zur Verfügung gestellt).

Neben den Plasmiden benötigt man einen Hefestamm bei dem die zur Selektion einer Interaktion verwendeten Gene unter die Kontrolle von Promotoren gestellt sind, die wiederum durch GAL4 reguliert werden. Die BD des GAL4 Transkriptionsfaktors erkennt als Dimer eine spezifische Sequenz, die so genannte *upstream activating sequence* (UAS) und bindet an diese. Angeschaltet wird der Promotor aber erst durch die AD. Da für den Y2H Screen diese beiden Domänen getrennt und an unterschiedliche Proteine fusioniert wurden, kommt es erst dann zur Transkription der Zielgene, wenn AD und BD sich in räumlicher Nähe befinden, was wiederum auf die Interaktion der beiden Fusionsproteine hindeutet. Nicht ausgeschlossen werden kann allerdings, dass es sich nicht um eine direkte Interaktion der Proteine handelt, sondern diese durch weitere in der Zelle vorliegende Moleküle vermittelt wird.

Auch trägt der Y2H Screen das Risiko falsch positive Interaktionspartner zu identifizieren. So ist es möglich, dass Proteine die an die BD fusioniert werden zu einer Aktivierung des Promotors führen. Andererseits können auch Proteine an der AD diese zur DNA rekrutieren und somit ebenfalls die Transkription einschalten. Deshalb ist es essentiell zu überprüfen, ob die zur Selektion verwendeten Gene wirklich nur bei Expression beider Fusionsproteine aktiviert sind oder ob bereits ein Partner genügt.

Auch die Wahl des geeigneten Hefestamms für eine Y2H Analyse ist für dessen Gelingen entscheidend. Es wurde zunächst der Stamm Y190 eingesetzt, eine positive Interaktion kann

anhand der Reportergene *lacZ* und *HIS3* gefunden werden (Harper *et al.*, 1993). Allerdings ist die Expression von *HIS3* nicht besonders strikt reguliert, weshalb dieser Stamm auf Minimalmedium ohne Histidin wächst. Verbessert werden kann dies durch die Verwendung von 3AT, einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3* Proteins, der das Hintergrundwachstum auf Medium ohne Histidin weitestgehend unterbinden kann (Durfee *et al.*, 1993). Bei Verwendung dieses Stammes sollte aber auch die Expression des zweiten Reporters *lacZ* über ein Aktivitäts-Assay untersucht werden. Die produzierte β -Galactosidase kann dabei z.B. direkt durch die Zugabe des Substrats X-GAL in die Selektionsplatten oder ein Filter-lift-Assay nachgewiesen werden. Für den Library-Screen hat es sich jedoch als praktischer erwiesen den Stamm AH109 zu verwenden, da hier die Expression von Histidin stärker reguliert ist und Adenin als zusätzlicher Selektionsmarker unter Kontrolle von GAL4 zur Verfügung steht (James, Halladay und Craig, 1996).

2.3.7.1 Beschreibung der verwendeten Plasmide

Eine schematische Darstellung aller für die Y2H Analyse verwendeten Plasmide ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die beiden Plasmide pGADT7 und pACT tragen eine Ampicillin Resistenz, die zur Klonierung und Isolierung des Plasmids in *E.coli* genutzt werden kann. Bei pGADT7 handelt es sich um eine Weiterentwicklung des ursprünglich verwendeten *library* oder *prey* Vektors pACT. Das Insert wird in beiden Fällen über die *multiple cloning site* an die AD fusioniert, wobei der neuere Vektor den Vorteil bietet, dass zwischen AD und Insert ein HA-tag eingebracht wird, welcher spätere antikörperbasierte Methoden erleichtert. Der *bait vector* pGBKT7 trägt zu diesem Zweck den schon erwähnten c-Myc-tag und zur Selektion in *E.coli* eine Kanamycin Resistenz.

In Hefe ist die Selektion von Plasmiden nur schwer, bzw. nur mit wenigen Antibiotika möglich. In dem hier verwendeten System werden daher Hefe Stämme eingesetzt die gentechnisch so modifiziert wurden, dass sie eine Reihe von Aminosäuren nicht selbst produzieren können. Dazu

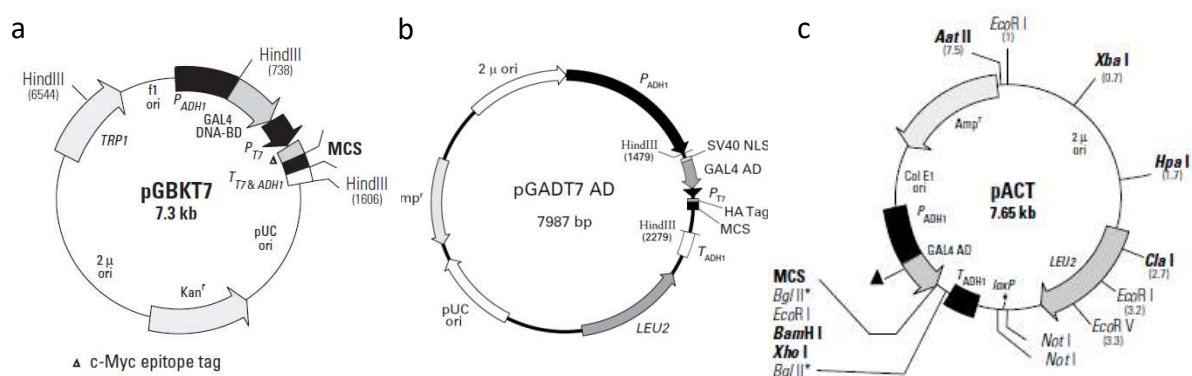


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der verwendeten Y2H Plasmide.

Das Einfügen von Genen in die *multiple cloning site* (MCS) führt zu einer Expression der kodierten Proteine in Hefe als Fusion mit der BD (a) bzw. AD (b und c). Die Darstellungen sind den Vektor Informationen PT3248-5 (a), PT3249-5 (b) und dem GAL4 Two-Hybrid Vectors Handbook PT3062-1 (c) von Clontech entnommen.

zählen Leucin (L) und Tryptophan (W). Auf Minimalmedium, welches diese Aminosäuren nicht enthält, können diese Hefe-Stämme folglich nicht wachsen. Die *library* Vektoren tragen das LEU2 und der *bait* Vektor das TRP1 Gen, welche wiederum ein Wachsen auf den entsprechenden Minimalmedien erlaubt und somit als Marker für die Transformation der Hefezellen verwendet wird.

2.3.7.2 Medien

Medium	Zusammensetzung
YPD	20 g/l Baktopepton, 10 g/l Hefeextrakt, der pH wurde mit HCl auf 5,8 eingestellt und auf 90% des Endvolumens aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde das entsprechende Volumen einer 20% Glucose-Lösung (autoklaviert) zugegeben, um 2% Glucose zu erhalten. Für Platten wurden 18 g/l Agar zugegeben
YPDA	YPD mit 2 mg/l Adenin
SD (<i>synthetic dropout</i>)-Agarplatten	1,7 g/l Hefe Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 5 g/l Ammoniumsulfat, 2 g/l entsprechender <i>drop out mix</i> . Der pH wurde mit HCl auf 5,8 eingestellt und auf 90% Endvolumen aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde das entsprechende Volumen einer 20% Glucose-Lösung (autoklaviert) zugegeben um 2% Glucose zu erhalten. Für Platten wurden 18 g/l Agar zugegeben
TB (<i>terrific broth</i>)	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 g/l Glycerol. Das Volumen wurde auf 90% des Endvolumens eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurde das entsprechende Volumen 10xTB-Salze zugegeben
10xTB-Salze	0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4
LB (<i>lysogeny broth</i>)	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, (für Platten: 15 g/L BactoAgar und ggf. 0,2% Glucose)

2.3.7.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Zunächst wurden für die Vorkultur 30 ml des entsprechenden Minimalmedium (SD ohne entsprechende selektive Aminosäuren) oder Vollmediums (YPD bzw. YPDA) mit einer Hefekultur inokuliert und über Nacht bei 30°C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml frisches und vorgewärmtes Medium mit 2 bis 3 ml der Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,2 bis 0,25 eingestellt und bei 30°C und 150 rpm inkubiert bis eine OD_{600} von 0,6 bis 0,8 erreicht war. Die Zellen befinden sich dann in der exponentiellen Wachstumsphase, welche in der Regel nach 4 bis 5 Stunden erreicht wurde. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 700xg, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ resuspendiert, bevor erneut wie beschrieben zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 2,5 ml Li-Ac-Lösung aufgenommen und in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 700xg, RT). Das Pellet wurde in 1 ml Li-Ac-Lösung resuspendiert. Die Zellen sind nun bereit zur Transformation.

Die für die Transformation benötigte Carrier-DNA wurde für 5 min bei 95°C denaturiert

(2,5 µl/Transformation) und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nun wurde die Transformationsansätze gemischt: zu jeweils 100 µl der vorbereiteten, kompetenten Zellen kamen 2,5 µl der denaturierten Carrier-DNA und 1-5 µl Plasmid-DNA (ca. 1 µg). Zu jedem Ansatz kamen 700 µl PEG-Lösung, durch kurzes vortexen wurde für eine gute Durchmischung gesorgt und dann die Transformationsansätze für 45 Minuten bei 30°C und 550 rpm im Heizblock (Eppendorf) oder Wasserbad inkubiert. Um eine gute Durchmischung sicher zustellen wurden die Ansätze etwa alle 10 Minuten gemischt. Der Hitzeschock erfolgte anschließend durch Inkubation im Heizblock (Eppendorf) oder Wasserbad bei 42°C für weitere 20 Minuten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1000xg, RT) pelletiert, mit 1 ml H₂O_{dest} gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert, bevor das Pellet in 400 µl H₂O_{dest} resuspendiert (für den *library screen* wurden die Zellen in YPDA resuspendiert) und auf Selektionsmedium (SD-LW) ausplattiert wurde. Auf dem Selektionsmedium können nur die transformierten Zellen wachsen. Nach etwa 3 bis 4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden Kolonien sichtbar.

Lösungen	Zusammensetzung
Li-Ac-Lösung	100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0
PEG -Lösung	40% PEG 4000 in Li-Acetate-Lösung
Carrier DNA	DNA aus Lachs-Sperma 10 mg/ml (Clontech)

2.3.7.4 Umwandlung der λ -Act cDNA *library* in eine Plasmid *library*

Die verwendete *library* wurde mit mRNA hergestellt, die aus adulten Arabidopsis (Ökotyp Nossen) Blättern und Wurzeln isoliert und mit Randomprimern in cDNA umgeschrieben wurde. Diese cDNA wurde mit Adaptoren versehen, *blunt-end* in die aufgefüllte XhoI Restriktionsschnittstelle des Plasmids pACT ligiert und somit an den c-Terminus der Gal4 Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert (siehe auch Durfee *et al.*, 1993). Anschließend wurden diese Plasmide in λ Phagen übertragen. Die Zahl der Transformanten betrug 1.9×10^6 , was somit die Komplexität der *library* angibt.

Um Plasmid DNA zu erhalten wurde der *E.coli* Stamm BNN132 mit den *library* enthaltenden Phagen infiziert. Dafür wurde der Stamm BNN132 zunächst auf LB Platten mit Kanamycin ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Mit einer gewachsenen Kolonie wurde die Vorkultur in 3 ml LB mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 4 ml Hauptkultur mit der Vorkultur angeimpft und wachsen gelassen, bis eine OD₆₀₀ von 0,38 erreicht wurde. Das entspricht etwa 3×10^8 Zellen/ml. Ein Aliquot der Zellen wurde als negativ Kontrolle zur Überprüfung der Transformationseffizienz zurück behalten.

Die Zellen wurden pelletiert (5000 rpm, 5 min) und das Pellet in 4 ml 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Zu den Zellen wurden nun 400 µl der Phagen gegeben, die die *library* tragen. Da die Phagen eine Konzentration von 5×10^8 pfu/ml haben entspricht das etwa 2×10^8 Phagen. Der Ansatz wurde ohne

schütteln für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 4 ml LB zugegeben und für 30 Minuten bei 30°C in einem Rollschüttler inkubiert.

Das Gemisch aus Phagen und Zellen wurde auf 60 LB Platten mit 50 µg/ml Ampicillin und 0,2% Glucose ausplattiert. Die Ampicillin-Resistenz ist auf dem pACT Vektor enthalten und dient folglich zu Selektion der transformierten BN132 Bakterienzellen. Da die *library* Plasmide unterschiedliche cDNA Fragmente tragen, kann durch diese auch das Wachstum der Bakterien unterschiedlich beeinflusst werden und es so zu einem Verlust von Konstrukten kommen, die das Wachstum inhibieren. Um diesen Effekt des Komplexitätsverlusts möglichst gering zu halten, sollte die *library* möglichst nicht weiter amplifiziert werden und die Selektion der positiven Transformanten fand auf LB-Platten und nicht in flüssig Medium statt. Dadurch wurde der Selektionsdruck auf langsam wachsende Konstrukte möglichst gering gehalten.

Die Inkubation erfolgte über Nacht im Dunkeln bei 37°C. Um die Effektivität der Transformation bestimmen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe ausplattiert. Die Kontrolle stellte eine Verdünnungsreihe mit uninfizierten Zellen dar, wobei hier kein Kolonie-Wachstum zu beobachten war. Das Wachstum des Transformationsansatzes war sehr stark und deutet darauf hin, dass fast jede Zelle transformiert wurde. Bei der Berechnung nicht berücksichtigt ist die Möglichkeit der Zellteilung nach bzw. während der Infektion. Auf den Platten mit dem unverdünnten Transformationsansatz ist ein gleichmäßiger Rasen gewachsen. Mit Hilfe eines sterilen Spatels wurden die Zelle mit LB Medium von den Platten gewaschen und in 2mal 1,5 l TB überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und schütteln inkubiert bis sie die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten. Die Zellen wurden pelletiert und bei -20°C gelagert bis die DNA von Jeanette Schermuly extrahiert wurde. Verwendet wurde dafür das Qiagen Plasmid Midi Kit von Qiagen (Hilden) nach Anweisung des Herstellers.

2.3.7.5 Yeast two hybrid library screen

Wie bereits erwähnt wurde CRY3 in den Vektor pGBKT7 kloniert (siehe auch 2.3.1.2), um die Interaktion von zwei Proteinen zu untersuchen. CRY3 wird somit als c-terminale Fusion mit der Gal4 BD in dem Hefestamm AH109 exprimiert und als *bait* verwendet. Die verwendete *library* mit cDNA aus Nossen befindet sich in dem Vektor pATC. Die Fragmente wurden darin mit der BD fusioniert (siehe auch 2.3.7.4).

Zunächst wurde pGKT7/CRY3 in AH109 transformiert und auf SD-W selektioniert (siehe 2.3.7.3). Die Transformation der *cry3* exprimierenden Zellen mit der *library* erfolgte ebenfalls nach dem beschriebenen Protokoll. Vor der eigentlichen Transformation wurde in einem kleinen Umfang die Transformationseffizienz überprüft, um eine ausreichende Abdeckung der *library* zu gewährleisten.

Für die Transformation mit der ganzen *library* wurden die *cry3* exprimierenden Zellen über Nacht wie beschrieben bis zur stationären Phase wachsen lassen (OD_{600} über 3), in 300 ml vorgewärmtem SD-W auf eine OD_{600} von 0,23 verdünnt und wie in 2.3.7.3 mit angepassten Mengen fortgefahren.

Zur Transformation wurden insgesamt 118,5 µg der *library* DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde auf vier 15 ml Röhrchen geteilt jeder enthielt 29,6 µg der *library* DNA, 55 µl der denaturierten Träger-DNA, 660 µl Hefezellen und 2,75 ml PEG-Lösung. Durch vortexen wurden die Ansätze gemischt. Nach Inkubation und Hitzeschock wurden die Zellen pelletiert (700xg, 5 min) und in insgesamt 6 ml YPDA aufgenommen. Zur Selektion auf eine Interaktion wurden jeweils 125 µl auf SD-LWAH ausplattiert (60 Platten) und zur Bestimmung der Transformationseffizienz eine Verdünnungsreihe auf SD-LWAH. Die Platten wurden bei 30°C im Dunkeln oder unter Blaulicht ($8,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert.

Auf den Selektionsplatten gewachsene Kolonien wurden auf SD-LWAH ausgestrichen, um das uniforme Wachstum zu prüfen und die DNA Fragmente mittels *colony* PCR überprüft.

Lösungen	Zusammensetzung
Li-Ac-Lösung	100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0
PEG -Lösung	40% PEG 4000 in Li-Acetate-Lösung
Carrier DNA	DNA aus Lachs-Sperma 10 mg/ml (Clontech)

2.3.7.6 Identifikation positiven Klone

Um nicht alle gewachsenen Kolonien sequenzieren zu müssen wurden die cDNA Sequenzen in den pACT Plasmiden zunächst mittels *colony* PCR amplifiziert und die Inserts mit einem häufig schneidenden Restriktionsenzym verdaut. Das Ergebnis wurde auf einem Agarose Gel beurteilt.

2.3.7.6.1 Colony PCR

Mit einer sterilen, 10 µl Pipettenspitze wurde etwas Kolonie gepickt und die Spitze in ein Reaktionsgefäß mit 0,2 µl 0,02M NaOH gestellt. Anschließend wurde durch vortexen gründlich gemischt und für 20 bis 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut gevortext und kurz bei 20000xg, RT zentrifugiert. 1 µl wurde als Template für die PCR eingesetzt und mit 24 µl Mastermix gemischt. Die verwendeten Primer pACT2 FW und RV binden dabei an die Sequenz des Plasmids und das Insert wird amplifiziert.

Reagenzien	10x PCR Ansatz [µl]
10x Thermopuffer NEB	25
dNTPs 10 mM	5
forward Primer 10 µM	10
reverse Primer 10 µM	10
Taq Polymerase NEB	2
Template	1 µl pro Ansatz
H ₂ O _{dest}	188

PCR Programm:

Temperatur	Dauer	Wiederholung
95°C	5 min	1x
95°C	35 s	37x
50°C	40 s	
72°C	40 s	
72°C	5 min	1x

Jeweils 5 µl der PCR-Ansätze wurden mit 5x Probenpuffer gemischt und auf einem 0,8% Agarose-Gel untersucht oder 14 µl der Ansätze zunächst mit MspI verdaut (siehe 2.3.3). Als Größen und Mengenmarker wurde die 2 *log-Ladder* verwendet.

2.3.7.6.2 Restriktion mit MspI

Für den Restriktionsverdau wurden die Reagenzien gemischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, mit 5x Probepuffer gemischt und auf einem 2% Agarose Gel aufgetrennt, als Größen und Mengenmarker wurde die 2 *log-Ladder* verwendet. Das Restriktionsenzym MspI schneidet die recht unspezifische Folge C↓CGG. Anhand des Musters wurde entschieden welche Kolonien sequenziert wurden und welche offensichtlich das gleiche Insert enthielten.

Reagenzien	1x Ansatz [µl]
PCR Produkt	14
10x Tango Puffer (Fermentas)	1
MSPI (Fermentas)	1

2.3.7.6.3 Sequenzierung

Die Produkte der *colony* PCR wurden mit dem *PCR-Purification Kit* von Qiagen aufgereinigt und zusammen mit dem pACT2 FW Primer zur Sequenzierung an GATC Biotech AG (Konstanz) gesendet. Wenn die Sequenz nicht das gesamte Insert abdeckte wurde der pACT2 RV Primer verwendet, um das Insert von der anderen Flanke aus zu sequenzieren. Damit wurde eine vollständige Abdeckung der Insertsequenzen erzielt.

2.3.7.7 Wiedergewinnung der Plasmide

Die Hefe mit den entsprechenden Plasmiden wurde über Nacht in SD-LWAH angezogen. 1,5 ml der Kultur wurden pelletiert (5000xg, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 100 µl STET aufgenommen. Glaskügelchen (0,2 g, Durchmesser 0,45 mm) wurden zugegeben und durch 5 Minütiges vortexen gründlich gemischt. Weitere 100 ml STET wurden zugegeben, kurz gemischt und dann für 3 Minuten auf 100°C erhitzt. Die Proben wurden kurz auf Eis gekühlt und dann bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. 120 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 60 µl 7,5 M Ammoniumacetat enthalten war und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert, bevor wie beschrieben bei 4°C zentrifugiert wurde. Anschließend wurden 120 µl des Überstandes mit 240 µl eiskaltem Ethanol gemischt und für 30 Minuten bei 20°C inkubiert, bevor erneut zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 25 µl TE aufgenommen. Auf einem Agarose-Gel wurden 5 µl überprüft und 10 µl wurden zur Transformation von chemisch kompetenten *Xl1blue E.Coli* verwendet, durchgeführt von Jeanette Schermuly. Zur Selektion wurde die Ampicillin Resistenz verwendet die auf pACT enthalten ist. Die Aufnahme des *library*-Plasmids und von pGBKT7/CRY3 ist zwar theoretisch möglich, ohne Selektionsdruck wird der Plasmid jedoch wieder verloren gehen.

Lösungen	Zusammensetzung
STET	8% w/v Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 , 50 mM EDTA, 5% Triton-X-100)
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 , 1 mM EDTA

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinextraktionen

2.4.1.1 Proteingesamtextrakt aus Blattmaterial (TCA/Aceton)

Das Pflanzenmaterial wurde zusammen mit zwei Stahlkugeln (Durchmesser 5 mm) in 2 ml Reaktionsgefäße von Eppendorf in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe der Zelmühle (Retsch, MM200) wurde das Material zu einem feinen Pulver zermahlen, in der Regel genügte dafür drei Zyklen mit 30 Sekunden bei 30 Hz. Es wurde darauf geachtet, dass das Pflanzenmaterial während der Prozedur nicht auftaute und ggf. erneut in Stickstoff gekühlt.

Das Pulver wurde schließlich mit 2 ml eiskaltem Extraktionspuffer gemischt und die Proteine für mindestens 2 Stunden auf Eis präzipitiert. Alternativ konnte die Fällung auch über Nacht bei -20°C durchgeführt werden. Anschließend wurden die Stahlkugeln entfernt und die präzipitierten Proteine dreimal mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20000xg, 10 min, 4°C) pelletiert. Um möglichst viele Pigmente und andere Kontaminationen zu entfernen, wurden die Pellets während der Waschschriffe für 10 min in einem Ultraschallbad bei 4°C resuspendiert und weitere 10 min schüttelnd, auf Eis inkubiert. Um alle Aceton Reste zu entfernen wurde das Proteinpellet für 10 min bei RT in der *Speed Vac* oder für 30 min bis 90 min bei RT unter einem Abzug getrocknet.

Das Pellet wurde ggf. mit Hilfe des Ultraschallbads in dem zu verwendeten Puffer resuspendiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (20000xg, 10 min, 4°C) entfernt. Sollten die Proteine direkt mittels SDS-Page weiter untersucht werden, wurden diese vor der Zentrifugation für 10 min in 1xSDS Probenpuffer aufgekocht.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	90% (v/v) Aceton; 10% (v/v) TCA; 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol
Waschpuffer	100% (v/v) Aceton
1xSDS Probenpuffer	45 mM Tris-HCl, pH 6,8; 50 mM Dithiothreitol (DTT); 1 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.1.2 TCA/Aceton Fällung von Proteinen

Um Proteine aus wässrigen Lösungen anzureichern oder störende Substanzen zu entfernen, können die Proteine mit Hilfe einer Mischung aus TCA und Aceton präzipitiert werden. Die Probe wurde dafür mit dem dreifachen Volumen Präzipitationslösung gemischt und für 1 Stunde auf Eis unter konstantem Schütteln inkubiert. Die Endkonzentration in der Probe war 8% (w/v) TCA, 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol und 75% (v/v) Aceton. Für die Fällung wurden 2 ml Reaktionsgefäße von

Eppendorf eingesetzt, da diese eine gute Beständigkeit gegenüber Aceton aufweisen.

Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min, 20000xg, 4°C) pelletiert und die Pellets mit Waschlösung 1 für 20 min unter Schütteln auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min, 20000xg, 4°C) pelletiert und das Waschen zweimal mit Waschlösung 2 wiederholt. Das Pellet konnte bei RT im Abzug oder in der *speed Vac* getrocknet werden, bevor das Pellet im gewünschten Puffer resuspendiert wurde.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Präzipitationslösung	100% (v/v) Aceton; 10,67% (w/v) TCA; 0,093% (v/v) β -Mercaptoethanol
Waschlösung 1	100% (v/v) Aceton; 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol
Waschlösung 2	80% (v/v) Aceton; 0,07% (v/v) β -Mercaptoethanol

2.4.1.3 Phenolextraktion von Proteinen

Im Gegensatz zu der Reinigung von Proteinen mittels TCA/Aceton Fällung bietet die Extraktion mit Phenol den Vorteil, dass besonders Nukleinsäuren effektiv entfernt werden (Hurkman und Tanaka, 1986). Das verwendete Protokoll basiert auf der von Hurkman und Tanaka entwickelten Methode und wurde nur leicht abgewandelt wie von Rode *et al.* 2012 beschrieben durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial wurden 250 μ g Chloroplastenprotein-Extrakte eingesetzt die mit 2,5xPhenolextraktionspuffer (PP) und 0,5 M Tris HCl pH 8,0 auf eine 1x Konzentration eingestellt wurden. Die Proteine in 1xPP wurden mit dem gleichen Volumen TE-Puffer gesättigtem Phenol gemischt und für 30 min bei RT und 1000 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die Phenolphase, die die Proteine enthält, wurde durch Zentrifugation (11000xg, 10 min, 4°C) von der wässrigen Phase getrennt. Die obere Phase (Phenolphase) wurde abgenommen und in einem neuen Gefäß mit dem gleichen Volumen 1xPP durch vortexen gemischt. Die Phasen wurden erneut durch Zentrifugation (11000xg, 10 min, 4°C) getrennt, anschließend wurde die Phenolphase abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Um die Proteine aus der Phenolphase zu präzipitieren, wurden die Gefäße mit der Präzipitationslösung auf 2 ml aufgefüllt und für mindestens 4 h bei -20°C präzipitiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (17000xg, 3 min, 4°C) pelletiert und dreimal mit Präzipitationslösung, zweimal mit 80% Aceton und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Während jedem Waschschrift wurde das Pellet mit Hilfe eines Ultraschallbads resuspendiert. Anschließend wurde das Pellet bei RT für 10-20 min getrocknet.

Lösungen	Zusammensetzung
2,5xPhenolextraktionspuffer	1,75 M Saccharose; 0,25 M KCl; 125 mM EDTA; 0,5 M Tris HCl pH 8,0
Präzipitationslösung	0,1 M Ammoniumacetat in Methanol

2.4.1.4 Pflanzliche Proteingestamtextakte in SDS-Probenpuffer

Wenn nur sehr geringe Mengen an Pflanzenmaterial verfügbar und die Reinheit der Extrakte sekundär war, wurden die Proteine direkt durch aufkochen in SDS-Probenpuffer extrahiert. Verwendet wurde diese Methode z.B. um die Proteinexpression in transgene Pflanzen mittels *Western blot* zu überprüfen.

Das Pflanzenmaterial wurde zusammen mit zwei Stahlkugeln (Durchmesser 5 mm) in 2 ml Reaktionsgefäße von Eppendorf in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe der Zelmühle (Retsch, MM200) wurde das Material zu einem feinen Pulver zermahlen, dafür genügten drei 30 sekundige Zyklen mit 30 Hz. Das Pulver wurde in 2,5fach SDS-Probenpuffer resuspendiert und 10 min bei 95°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (20000xg, 5 min, RT), der Überstand abgenommen und SDS-Probenpuffer wurde mit H₂O_{dest.} auf die einfache Konzentration verdünnt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1xSDS Probenpuffer	45 mM Tris-HCl, pH 6,8; 50 mM DTT; 1 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.1.5 Proteingestamtextakt aus Hefe

Das Protokoll ist angelehnt an Kushnirov (2000) und stellt eine schnelle Variante da Proteine aus Hefezellen zu isolieren, um sie danach über eine SDS-PAGE zu untersuchen.

Die Zellpellets aus 1,8 ml Übernachtskultur (Zentrifugation 5000xg, 5 min, RT) wurden mit 200 µl 0,1 M NaOH für 5 min bei RT inkubiert und anschließend pelletiert (5000xg, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 50 µl 1xSDS Probenpuffer resuspendiert und 3 min auf 95°C erhitzt. Die nun gelösten Proteine wurden von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (10 min, 20000xg, RT) getrennt.

Die Proteinmenge des Überstands wurde mit Amidoschwarz bestimmt (siehe 2.4.2.1).

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
1xSDS Probenpuffer	45 mM Tris-HCl, pH 6,8; 50 mM DTT; 1 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.1.6 Native Proteinextrakte aus Pflanzen

Native Proteinextrakte wurden je nach Verwendung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Detergenz hergestellt die im Text vermerkt sind. Auf ein Einfrieren des Pflanzenmaterials wurde bewusst verzichtet um die Proteine unter möglichst nativen Bedingungen isolieren zu können. Die Blätter wurden in eiskaltem Extraktionspuffer mit dem Polytronblender zerkleinert. Für größere Proteinmengen wurde ein schmales Becherglas oder 50 ml Falcon und für kleinere ein 2 ml Reaktionsgefäß mit entsprechendem Aufsatz des Polytronblenders verwendet. Bei noch kleineren

Ausgangsmengen kamen 1,5 ml Reaktionsgefäße zum Einsatz, in denen das Blattmaterial mit sterilen Stößeln zerrieben wurde. Pro 200 mg Ausgangsmaterial wurden dabei 100 µl Puffer eingesetzt. Alle Arbeiten wurden dabei im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt. Um die Gefahr eines proteolytischen Abbaus der Proteine weiter zu minimieren, wurde wenn angegeben die 1x *complete Mini, EDTA-free* Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) eingesetzt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20000xg, 10 min, 4°C) entfernt, der Überstand enthielt die Proteine und wurde weiterverwendet.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10%Glycerol, 1 mM DTT wurden vor der Verwendung zugegeben

2.4.1.7 Native Proteinextrakte aus Keimlingen

Um die Proteinmenge während der Deetiolierung von Keimlingen zu untersuchen wurden diese wie unter 2.3.5.1 beschrieben auf Filterpapier ausgesät und die Keimung induziert, das etiolierte Wachstum erfolgte für 3 Tage in Dunkelheit in der Phytokammer. Danach wurden die Keimlinge für 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden belichtet (Weißlicht). Die Keimlinge wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Keimlinge wurden in nativem Extraktionspuffer 2 mit einem Polytronblender zerkleinert und für 15 min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine und die Konzentration wurde mittels Bradford-Assay (siehe 2.4.2.2) bestimmt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer 2	10 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10%Glycerol

2.4.1.8 Isolation von Chloroplastenproteinen

Die Isolation von Chloroplasten erfolgte wie von Kley et al beschrieben (Kley *et al.*, 2010). Die Besonderheit an dieser Methode ist, dass die Isolation sehr schnell und mit wenig Ausgangsmaterial erfolgen kann und dennoch ausreichende Mengen an angereicherten Chloroplasten liefert, um Proteom-Analysen durchzuführen.

Pro 3 g Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurden dabei zunächst zwei 15 ml Schraubdeckelröhrchen mit je 2,5 ml 2x-Chloroplastenpuffer (2xClpp.) und 2,5 ml Percoll befüllt. Gemischt wurde durch invertieren der Röhrchen und diese bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Isolation der Chloroplasten wurden Rosettenblätter von adulten, im Kurztag gewachsenen *Arabidopsis thaliana* verwendet. Die Blätter wurden abgeschnitten, in ein auf Eis gekühltes Gefäß gegeben und mit kaltem (4°C) 1xClpp gemischt. Auf 3 g Blattmaterial kamen dabei 23 ml Puffer. Die Größe des verwendeten Gefäßes richtete sich nach der Menge an Blattmaterial. Prinzipiell muss

darauf geachtet werden ein möglichst schmales und hohes Gefäß zu verwenden, da das Blattmaterial im nächsten Schritt mit einem Polytronmixer zerkleinert wird. Bei geeignetem Gefäß reichen hierfür 3 Zyklen von jeweils 15 s. Diese und alle folgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt, außerdem wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Puffer eiskalt waren und zum pipettieren des Zellhomogenats nur abgeschnittene Spitzen verwendet. Das zerkleinerte Blattmaterial wurde durch drei Lagen Miracloth gefiltert um Blattstücke zu entfernen. Der Durchfluss wurde vorsichtig auf die vorbereiteten 50% Percollkissen geladen und für 10 min bei 2000xg in einem Schwenkbecherrotor (Heraeus *swing bucket rotor* 8179, Laborfuge 400R) mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Auf Grund des hohen Sedimentationskoeffizients von intakten Chloroplasten werden diese pelletiert, während zerstörte Chloroplasten und andere Zellbestandteile oberhalb der Percollschicht verbleiben. Ebenfalls pelletiert wurde allerdings die Stärke die aus beschädigten Chloroplasten freigesetzt wurde. Der Überstand wurde folglich verworfen, zum Waschen des Pellets wurden die Röhrchen mit je 14 ml kaltem 1xClpp. aufgefüllt und invertiert. Zum Pelletieren der Chloroplasten wurden die Röhrchen für 5 min im Schwenkbecherrotor mit ausgeschalteter Bremse bei 1000xg zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde je nach weiterer Verwendung in unterschiedlichen Puffern resuspendiert, um die Chloroplastenproteine zu Isolieren.

Sollte die Qualität der Extraktion mikroskopisch überprüft werden, wurde vor dem zweiten Zentrifugationsschritt ein kleines Aliquot entnommen und im Phasenkontrast mikroskopiert (verwendet wurde das Bx51 von Olympus (Hamburg) mit dem Objektiv V Plan FL N 100x/1,30 Oil Ph3). Dabei macht man sich den Umstand zu Nutze, dass nur intakte Chloroplasten im Phasenkontrast einen leuchtenden Halo zeigen (Walker, 1965).

Puffer	Zusammensetzung
1xClpp.	300 mM Sorbitol; 50 mM Hepes; 5 mM EGTA; 5 mM EDTA; 1mM MgCl ₂ ; 10 mM NaHCO ₃ ; 0,25 mM DTT (frisch zugeben); pH mit KOH auf 7,2 eingestellt

2.4.1.8.1 Chloroplasten Aufbruch Variante 1

Die Chloroplastenproteine wurden durch einen Aufbruch der Organellen frei gesetzt, verwendet wurde dafür zunächst ein hypotonisches Medium (Aufschlusspuffer oder PEG Extraktionspuffer) indem die Organellen resuspendiert wurden. Zusätzlich wurden die Chloroplasten dreimal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und auf 25°C erwärmt. Durch Zentrifugation bei 20000xg für 20 min, bei 4°C wurden unlösliche Bestandteile pelletiert. Der Überstand enthält die löslichen und solubilisierten Proteine. Die Lagerung der isolierten Proteine erfolgte bei -20°C.

Der Aufschlusspuffer wurde genutzt wenn nur lösliche Chloroplastenproteine isoliert werden sollen, der PEG-Extraktionspuffer enthält hingegen das Detergenz NP-40 und solubilisiert damit unlösliche Proteine. Ebenfalls eingesetzt wurde der PEG-Puffer bei einer folgenden PEG-Fraktionierung.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	20 mM TES; 5 mM MgCl ₂ ; mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
PEG-Extraktionspuffer	0,5 M Tris HCl pH 7,8; 2% (v/v) NP-40; 20 mM MgCl ₂ ; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 1 mM Phenylmethylsulfonyl (PMSF); 1 mM EDTA; 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVPP)

2.4.1.8.2 Chlorplastenaufbruch Variante 2 (Interaktionsstudien)

Die Chloroplasten wurden in nativen Extraktionspuffer mit oder ohne Detergenz (zum Beispiel 0,5% NP-40 und 0,1% Triton X 100) aufgenommen und gevortext. (Initial wurden die Chloroplasten 5 min im Ultraschallbad inkubiert, da sich dadurch keine höhere Proteinausbeute zeigte wurde auf diesen Schritt verzichtet zu Gunsten nativerer Bedingungen innerhalb des Extrakts). Das Lysat wurde für 10 min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert. Die Löslichen Bestandteile wurden weiter verwendet bzw. bei -20°C gelagert.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM DTT und 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) wurden vor der Verwendung zugegeben

2.4.1.9 PEG-Fraktionierung

Die Fraktionierung mit PEG von Chloroplastenproteinen wurde genutzt um den störenden Einfluss von sehr abundanten Proteinen, wie RuBisCO, zu reduzieren und damit in der 2D-Gelelektrophorese die Möglichkeit zu haben auch weniger abundante Proteine zu verfolgen. Die Chloroplastenproteine in PEG-Extraktionspuffer (siehe 2.4.1.8.1.) wurden mit einer 50% (w/v) P-Lösung auf eine Konzentration von 8% (w/v) PEG eingestellt und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine 10 minütige Zentrifugation (1500xg, 4°C) wurden die präzipitierten Proteine abgetrennt und aufgehoben. Der Überstand wurde wie beschrieben auf eine PEG Konzentration von 16% (w/v) eingestellt, für 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (15 min, 1500xg, 4°C). Der Überstand der 16% PEG Fraktion war nahezu frei von RuBisCO. Die PEG-Pellets wurden zweimal mit eiskaltem Methanol gewaschen und Pflanzenpigmente zu entfernen. Die Proteine aus der Überstandsfraction wurden mit TCA/Aceton gefällt (siehe 2.4.1.2), bevor alle Pellets in den gewünschten Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
PEG-Extraktionspuffer	0,5 M Tris HCl pH 7,8; 2% (v/v) NP-40; 20 mM MgCl ₂ ; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 1 mM Phenylmethylsulfonyl (PMSF); 1 mM EDTA; 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVPP)
PEG-Lösung	50 % (w/v) Polyethylenglycol 3500

2.4.1.10 Isolation von Thylakoidmembran-Proteinen

Die Isolation von Thylakoidmembranen aus *Arabidopsis thaliana* wurde im Wesentlichen wie von Järvi *et al.* (2011) beschrieben durchgeführt. Etwa 2 g frisches Blattmaterial wurden in 25 ml HGB aufgenommen, mit einem Polytronmixer zerkleinert und anschließend durch drei Lagen Miracloth gefiltert. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation bei 5000xg und 4°C für 4 min pelletiert. Dieser rohe Chloroplastenextrakt wurde in 15 ml HSB resuspendiert, die niedrige Sorbitol Konzentration in diesem Puffer führt zu dem Aufbruch der Organellen, durch einen osmotischen Schock. Die Thylakoidmembranen wurden durch Zentrifugation wie oben beschrieben pelletiert, in 10 ml HSTB aufgenommen und erneut wie beschrieben pelletiert. Die im Pellet enthaltenen Thylakoidmembran-Proteine wurden in PEG-Puffer (der 2% NP-40 enthält) solubilisiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 15 min bei 12000xg und 4°C abgetrennt.

Lösungen	Zusammensetzung
Hepes-Grinding-Puffer (HGB)	50 mM Hepes/KOH pH 7,5; 330 mM Sorbitol; 2 mM EDTA; 1mM MgCl ₂ ; 5 mM Ascorbat; 0,05% (w/v) BSA
Hepes-Schock-Puffer (HSB)	50 mM Hepes/KOH pH 7,5; 5 mM Sorbitol; 5 mM MgCl ₂
Hepes-Lagerungs-Puffer (HSTB)	50 mM Hepes/KOH pH 7,5; 100 mM Sorbitol; 10 mM MgCl ₂

2.4.2 Proteinmengenbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Reagenzien verwendet: Amidoschwarzlösung und Bradford-Reagenz. Während die Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) weniger Aufwändig ist und eine höhere Genauigkeit liefert, ist die Verwendung von Amidoschwarz unempfindlich gegenüber Detergenzien und anderen Substanzen, die im Bradford-Assay stören würden. Da es bei der Verwendung von Amidoschwarz zu einer Präzipitation der Proteine kommt, kann sogar die Proteinkonzentration in SDS-Probenpuffer bestimmt werden. Je nach Pufferzusammensetzung wurde daher entschieden welche Methode zur Proteinmengenbestimmung eingesetzt wurde.

2.4.2.1 Amidoschwarz

Bei der Nachweismethode mit Amidoschwarz 10B werden die Proteine durch ein Methanol-Essigsäuregemisch präzipitiert und der Farbstoff bindet an die Aminogruppen gefällten Proteine (Popov *et al.*, 1975). Da der Farbstoff in der Präzipitationslösung sehr stabil ist muss eine Kalibrierung nicht vor jeder Messung durchgeführt werden. Für eine Kalibrierung der frisch angesetzten Lösung wurde eine Kalibriergerade durch die Messung von 0, 5, 19, 15, 20 und 25 µg

BSA erstellt, wobei diese Mengen aus einer Stammlösung mit 4 mg/ml verdünnt wurden. Bei jeder Proteinmengenbestimmung wurde eine Leerprobe mitgeführt, die lediglich Wasser oder den jeweiligen Puffer enthielt. Alle Proben wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf ein Volumen von 0,2 ml gebracht und 0,8 ml Amidoschwarzlösung zugegeben. Die Proben wurden durch gründliches vortexen gemischt und gefällte Proteine mit gebundenem Farbstoff durch Zentrifugation pelletiert (1000xg, 12 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet durch vortexen in 1 ml Waschlösung gereinigt und erneut pelletiert (10000xg, 12 min, RT). Die Waschlösung wurde entfernt und die Pellets für 15 min bei RT getrocknet, bevor diese in 1 ml NaOH resuspendiert wurden. Der stark basische pH führt zu einer Ablösung des Farbstoffs von den Proteinen, so dass das freie Amidoschwarz photometrisch bestimmt werden kann. Die Messung der Absorption erfolgte bei 615 nm gegen die Leerprobe. Anhand der Kalibriergerade konnte schließlich die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Amidoschwarzlösung	10% (v/v) Essigsäure; 90% (v/v) Methanol; Amidoschwarz (bis $\text{OD}_{615}=10$)
Waschlösung	10% (v/v) Essigsäure; 90% (v/v) Methanol
NaOH	0,2 M NaOH

2.4.2.2 Bradford-Assay

Diese Methode beruht auf der Ausbildung eines Komplexes zwischen dem Farbstoff Coomassiebrilliantblau G 250 und den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen im sauren Milieu. Diese Komplexbildung führt zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften des Farbstoffs: das Maximum bei 465 nm verschiebt sich zu 595 nm (Bradford, 1976). In der von Bradford beschriebenen Methode wird die Zunahme der Absorption bei 590 nm gemessen und anhand dieser die Proteinmenge bestimmt. Hier wurde eine abgewandelte Methode eingesetzt, die eine noch höhere Sensitivität liefert. Dafür wurde ebenfalls die Absorption bei 450 nm bestimmt und der Quotient von 590 nm und 450 nm zur Bestimmung der Proteinmenge verwendet (Zor und Selinger, 1996).

Als Bradford-Reagenz wurde das kommerzielle Roti®-Nanoquant von Roth (Karlsruhe) genau nach Anweisung des Herstellers verwendet. Zur Messung wurden die Proben mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf ein Volumen von 200 μl gebracht. Das Roti®-Nanoquant wurde 1:5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt, durch einen Faltenfilter geklärt und 0,8 ml zu den Proben gegeben. Zur Herstellung einer Kalibriergeraden wurde eine BSA-Stammlösung (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) verwendet, die bei 4°C gelagert wurde. Mit der Stammlösung wurden Verdünnungen mit 0,2 μg bis 15 μg BSA hergestellt und analog zu den Proben prozessiert. Die Absorption bei 590 nm und 450 nm wurde bestimmt, der Quotient $\text{OD}_{590/450}$ gegen die Proteinmenge aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Mit Hilfe dieser Kalibriergerade konnte nachfolgend die Konzentration der Proben bestimmt werden, sofern sie sich innerhalb des

linearen Messbereichs befanden. Die Kalibrierung musste spätestens nach einer Woche oder frischer Verdünnung des Reagenzes erneuert werden, da der Farbstoff relativ Anfällig gegen Umwelteinflüsse ist.

2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können in Gelen, die aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehen, aufgetrennt werden, bei der Polymerisation bilden diese Komponenten eine netzartige Struktur. Um die Proteine in den Polyacrylamid-Gelen aufzutrennen, wird ein elektrisches Feld angelegt. Proteine haben keine einheitliche Ladung und würden daher in unterschiedliche Richtungen (zur Anode oder Katode) wandern, deshalb ist es essentiell den Proteinen eine einheitliche Ladung und ggf. auch Form zu geben. Dies kann unter komplett denaturierenden Bedingungen stattfinden, es ist aber auch möglich ganze Proteinkomplexe in nativen Gelen aufzutrennen.

2.4.3.1 SDS-PAGE nach Lämmli

Die Proteine sollen bei der Gelelektrophorese nach Lämmli annähernd ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Verwendet wird hierfür das anionische Detergenz SDS, welches sich sehr konstant der Masse entsprechend an Proteine lagert und ihnen so eine einheitliche Ladung verleiht, die unabhängig von der Proteinsequenz ist. Die Denaturierung der Proteine erfolgte mittels Hitze durch 10 Minütiges aufkochen im Heizblock (Eppendorf), Schwefelbrückenbindungen wurden dabei durch den Einsatz von DTT gelöst.

Das Gel selbst besteht aus Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 37,5:1. Das Sammelgel mit 3,5% Acrylamid dient der Fokussierung der Proteinspuren, die Auftrennung nach Größe findet im Trenngel statt, das in der Regel 10% oder 12,5% Acrylamid enthält. Das Sammelgel ist damit wesentlich grobporiger, weist aber vor allem auch eine grundlegend andere Puffereigenschaften auf und hat einen pH von 6,8. Im Sammelgel wandern die mit SDS beladenen Proteine in einem elektrischen Feld zwischen den Chlorid Ionen (die sich am schnellsten bewegen) und den Glycin Molekülen (die nur zu einem kleinen Teil in der anionischen Form vorliegen und daher langsam sind). Langsamere Proteine werden durch das lokale elektrische Feld beschleunigt, bis sie die Chlorid Ionen Front erreichen, da dort wiederum sehr viele Ladungsträger vorhanden sind werden die Proteine hier gebremst. Dadurch kommt es zu einer größenunabhängigen Fokussierung der mit SDS assoziierten Proteine auf Höhe der Chlorid Ionen Front, was als scharfe Linie sichtbar wird (die Proteinprobe wurde durch Bromphenolblau im 5xSDS-Probenpuffer angefärbt). Das Trenngel hat einen pH von 8,8 und liegt damit 2 pH Einheiten über dem des Sammelgels. Glycin liegt nun vollständig in der anionischen Form vor und überholt auf Grund der größeren Beweglichkeit die

SDS-Proteinkomplexe, die Komplexe werden in Folge nicht mehr beschleunigt und der Sammeleffekt geht verloren. Durch das Trenngel wandern sie nun dem Molekulargewicht entsprechend, kleinere SDS-Proteinkomplexe wandern dabei schneller durch das Polyacrylamid-Gel.

Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten, *spacer* und Kämme zunächst gründlich gereinigt und die Glasplatten zusätzlich mit Aceton gesäubert. Zum Gießen wurde eine Mini Protean® Gelapparatur verwendet (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). In Abwandlung zu Lämmli wurde eine dünne Schicht eines schnell polymerisierenden Abdichtgels eingesetzt, um ein Auslaufen der Apparatur zu verhindern. Der Radikalstater APS und der Polymerisationskatalysator Temed wurden direkt vor dem Einfüllen der entsprechenden Gelansätze zugegeben. Nach Polymerisation des Abdichtgels wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert und mit 50% (v/v) Isopropanol überschichtet, um eine ebene luftblasenfreie Oberfläche zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurde das 50% Isopropanol abgeschüttet, mit H₂O_{bidest.} gespült und letzte Wasserreste mit Hilfe von Filterpapier entfernt. Das Sammelgel wurde hinein pipettiert und die Kämme eingesetzt. Die Gele wurden nach der Polymerisation direkt verwendet oder für maximal eine Woche in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert.

Vor jeder elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine in SDS Probenpuffer für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Ein oder zwei Gele wurden in die Mini Protean® Gelkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt, der Elektrophoresepuffer eingefüllt und die Kämme entfernt. Bis zu 20 µl der Proben wurden in die Taschen geladen, sowie der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas) als Größenstandard. Die Gelelektrophorese wurde bei einem in die Elektrophoresekammer eingespannten Gel mit 30 mA oder mit 60 mA bei zwei Gelen und maximal 300 V durchgeführt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Abdichtungsgel	10 % (w/v) Acrylamid; 0,265 % (w/v) Bisacrylamid; 0,37 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 1,6 % (w/v) APS; 0,24 % (v/v) Temed
Trenngel 10%	10 % (w/v) Acrylamid; 0,265 % (w/v) Bisacrylamid; 0,37 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,4 % (w/v) APS; 0,06 % (v/v) Temed
Trenngel 12,5%	12,5 % (w/v) Acrylamid; 0,33125 % (w/v) Bisacrylamid; 0,37 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,4 % (w/v) APS; 0,06 % (v/v) Temed
Sammelgel	3,5 % (w/v) Acrylamid; 0,13 % (w/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,2 % (w/v) SDS; 0,7 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) Temed
5xSDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6,8; 250 mM DTT; 5 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer	250 mM Tris-HCl; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS

2.4.3.2 Phos-tag™ SDS PAGE

Phosphorylierte Proteine sind in einer gewöhnlichen SDS-PAGE schwer von unphosphorylierten Proteinen oder anderen Modifikationen zu unterscheiden. Eine bessere Unterscheidung ist unter

Verwendung des isoelektrischen Punkts möglich, wie es zum Beispiel in der 2D PAGE stattfindet. Das Molekül Phos Tag™ (Wako Chemicals, Neuss) stellt eine andere Möglichkeit dar. Das Molekül wird direkt dem Polyacrylamid Trenngel beigefügt, dort interagiert es mit den Phosphorylierungen und verlangsamt so die Migration im Gel. Das Gießen der Gele erfolgte wie in 2.4.3.1 beschrieben mit den unten aufgeführten Gelzusammensetzungen.

Um ein einzelnes Protein zu betrachten wurden die Proteine auf dem Phos-tag™ Gel mittels Western blot auf die *low fluorescent* PVDF Membran übertragen und die Immunodetektion erfolgte mit Anti-Ha *high affinity* und Anti-rat HRP (siehe 2.4.6.2). Um weiteren Aufschluss darüber zu gewinnen ob mögliche zusätzliche Banden auf Phosphorylierungen zurück zu führen sind wurden die Proben mit der *shrimp alkaline phosphatase* (Fermentas) (SAP) gemäß der Hersteller Anweisungen dephosphoryliert (30 min 37°C). In den Proben die nicht dephosphoryliert werden sollte wurde Natrium Orthovanadate (25 mM) zugesetzt. Als Kontrolle wurde auch die *protein phosphatase 1* (PP1) von NEB mit bzw. ohne 10 mM Natrium Orthovanadate eingesetzt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Abdichtungsgel	10 % (w/v) Acrylamid; 0,265 % (w/v) Bisacrylamid; 0,37 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 1,6 % (w/v) APS; 0,24 % (v/v) Temed
Phos tag™ Trenngel 7%ig	7 % (w/v) Acrylamid; 0,186 % (w/v) Bisacrylamid; 0,37 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,04 mM MnCl ₂ , 0,02 mM Phos-tag™, 0,4 % (w/v) APS; 0,06 % (v/v) Temed
Sammelgel	3,5 % (w/v) Acrylamid; 0,13 % (w/v) Bisacrylamid; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,2 % (w/v) SDS; 0,7 % (w/v) APS; 0,05 % (v/v) Temed
5xSDS Probenpuffer MnCl ₂	225 mM Tris-HCl, pH 6,8; 250 mM DTT; 5 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 2,3 mM MnCl ₂
Elektrophoresepuffer	250 mM Tris-HCl; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS

2.4.4 Visualisierung von Proteinen

Proteine auf Polyacrylamid-Gelen können durch eine Reihe von Methoden sichtbar gemacht werden. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich dabei stark in der Sensitivität und der Auswirkung auf nachfolgende Prozesse, doch auch in den Kosten und der Handhabung.

Eine sehr schnelle und kostengünstige Lösung ist der Einsatz von Coomassiebrilliantblau R-250. Der blaue Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten von Proteinen an, die Intensität der Färbung ist damit auch von der Basizität eines Proteins und nicht allein von dessen Größe oder Menge abhängig. Da diese Methode einfach, kostengünstig und effektiv genug ist wurde sie als Standard zum Färben von Polyacrylamid-Gelen verwendet. Damit sich der Protein-Farbstoffkomplex ausbilden kann ist ein saures Milieu nötig, welches durch den Einsatz von Essigsäure erreicht wurde. Der Einsatz der Säure wirkt sich auf nachfolgende Massenspektrometrie allerdings negativ aus. Eine höhere Kompatibilität mit nachfolgenden Prozessen zeigt die Verwendung von kolloidalem Coomassie, welches daher hauptsächlich für das Färben von 2D Gelen oder 1D Gelen, die

nachfolgend massenspektrometrisch untersucht wurden, verwendet. Eine sehr hohe Sensitivität weist die Silberfärbung auf, diese ist jedoch vergleichsweise aufwändig und mit massenspektrometrischen Untersuchungen nur bedingt kompatibel. Die Proteine werden zunächst im Gel fixiert, bevor eine Silbernitratlösung zugegeben wird. Die Silberionen lagern sich an die Proteine an und werden im nachfolgenden Schritt zu elementarem Silber reduziert. Dies ähnelt den Anfängen der Fotografie und Bildentwicklung. Auf dem Gel werden schwarze, braune aber auch negative Banden sichtbar die ungefärbt oder weißlich erscheinen. Die Färbung ist nicht stöchiometrisch, die Sensitivität der Färbung kann allerdings durch den Zeitpunkt, wann die Entwicklung gestoppt wird, stark variiert werden. So können auch sehr kleine Proteinmengen sichtbar gemacht werden.

Eine andere Methode Proteine zu visualisieren ist der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Verwendet wurde *Deep purpleTM total protein stain* von GE Healthcare (Wessling, Deutschland). Der Farbstoff stammt aus dem Pilz *Epicoccum nigrum* und lagert sich an die SDS Micellen um die Proteine an. Daher färbt er weitgehend Sequenz unspezifisch und zeigt eine hohe Linearität in Bezug auf die Proteinmenge. Detektiert werden kann der Farbstoff mit dem LI-COR Odyssey[®] *imaging system* dem Typhoon[®] Trio Scanner (GE Healthcare). Die Sensibilität beim Färben von Polyacrylamid-Gelen lag in unserem Labor über der von konventionellem Coomassie, war jedoch niedriger als die von Silber und etwa vergleichbar mit kolloidalem Coomassie. Im Wesentlichen wurde der Farbstoff eingesetzt um Proteine auf *Western blot* Membranen zu visualisieren und zu quantifizieren.

Eine andere Art von Fluoreszenzfarbstoffen bindet kovalent an die Proteine. Für die differentielle 2D-Gelelektrophorese wurden die *CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for ETTAN DIGE* von GE Healthcare (Wessling, Deutschland) verwendet. Diese Farbstoffe sind sehr sensitiv aber auch teuer und es wird ein spezieller Scanner (Typhoon[®] Trio (GE Healthcare)) benötigt, welcher in der AG Lingelbach zur Verfügung stand. Die Proteine werden vor der elektrophoretischen Auftrennung markiert. Es wird eine kovalente Amidbindung zwischen dem NHS Ester des Farbstoffs und der ϵ Aminogruppe der proteineigenen Lysine ausgebildet. Es gibt drei Farbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5 die später mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen separat detektiert werden können. In der Regel wurden zwei Proben und eine Kontrolle in einer elektrophoretischen Auftrennung untersucht. Bei der Markierung handelt es sich um eine Minimalmarkierung, nur etwa 1 bis 2% der in den Proteinen vorkommenden Lysine werden tatsächlich markiert. Dies hat den großen Vorteil, dass die Proteine nachfolgend massenspektrometrisch untersucht werden können.

2.4.4.1 Coomassie Brilliant Blau R250

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel in eine verschließbare Plastikbox überführt und mit Färbelösung bedeckt. In der Mikrowelle wurde die Flüssigkeit in geschlossenem Behälter erhitzt bis ein leichtes Sieden zu beobachten war. Es folgte eine 20 Minütige Inkubation bei RT auf einem Schüttler (etwa 20 rpm). Die Färbelösung wurde gegen Frische getauscht und erneut für 20 Minuten wie beschrieben inkubiert. (Die benutzte Färbelösung wurde dabei gesammelt und konnte nach Filterung mehrfach verwendet werden). Dann wurde die Lösung gegen Entfärber getauscht, mit dem ungebundener Farbstoff entfernt werden sollten. Das Gel wurde im Entfärber kurz in der Mikrowelle erhitzt und für 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Der blau gefärbte Entfärber wurde gegen Frischen getauscht, jetzt waren erste Proteinbanden zu erkennen. Für ein optimales Ergebnis wurde das Gel über Nacht bei RT und leichtem Schütteln inkubiert.

Die Dokumentation erfolgte mit dem LI-COR Odyssey®-Scanner unter Verwendung des 700 nm Kanals oder eines handelsüblichen Flachbettscanners. Um die Gele zu konservieren wurde diese zwischen zwei lagen feuchter Cellophan Folie in einen Rahmen gespannt und für bis zu 3 Tagen bei RT trocknen gelassen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassiebrilliantblau R-250
Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure

2.4.4.2 Kolloidale Coomassie Färbung

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie ist nicht nur sehr gut mit nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen kompatibel, sie ist auch sehr sensitiv. Das kolloidale Coomassie liegt als Suspension vor, weshalb darauf zu achten ist die Färbelösung vor Verwendung gründlich zu schütteln. Die Lagerung der Lösung erfolgte lichtgeschützt und für maximal 6 Monate.

Zum Färben wurde die Färbelösung mit 20% (v/v) Methanol versetzt und gemischt. Das Gel wurde in eine saubere Plastikdose transferiert, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und mit der vollständigen Färbelösung inklusive Methanol bedeckt (mindestens aber 60 ml pro Gel). Die Proteine wurden über Nacht, bei RT, auf einem Schüttler angefärbt. Am nächsten Tag wurde der Gelhintergrund mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ entfärbt. Das Wasser wurde dazu mindestens dreimal getauscht und für jeweils etwa 1 Stunde entfärbt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A	2,04% (v/v) Orthophosphorsäure, 10,2% (w/v) Ammoniumsulfat (vorgelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$)
Lösung B	5% (w/v) Coomassie Brilliantblau G250
Färbelösung	16 ml Lösung B mit 784 ml Lsg A mischen. Ergibt: 2% (v/v) Orthophosphorsäure, 10% (w/v) Ammoniumsulfat, 0,1% Coomassie Brilliantblau G250

2.4.4.3 Silberfärbung

Der Erfolg der Silberfärbung ist auch davon abhängig, dass alle verwendeten Gefäße sauber und die benötigten Lösungen nicht zu alt sind. Diese sehr sensitive Färbung wurde auch auf Gelen angewendet die bereits mit Coomassie gefärbt waren, dabei ist eine komplette Entfärbung des Gelhintergrunds entscheidend, wofür diese über Nacht bei RT auf einem Schüttler in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ inkubiert wurden. Das verwendete Protokoll orientiert sich an Chevallet *et al.* (2006). Bei ungefärbten Gelen wurden zunächst die Proteine fixiert. Dafür wurden die Gele in saubere Plastikboxen transferiert und kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen. Die Gele wurden dann für mindestens 30 min in 30% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure fixiert. Die Fixierlösung wurde durch mehrmaliges waschen mit 20% (v/v) Ethanol und anschließend $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ entfernt.

Es folgte die Sensibilisierung des Gels für die folgende Färbung, dafür wurde es für 30 min in der DTT-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. In dieser Zeit wurde Lösung C angesetzt. Die DTT-Lösung wurde gegen Lösung C ausgetauscht die das Gel vollständig bedeckte. Die Proteine im Gel wurden nun für 12 min gefärbt. Anschließend wurde das Gel so lange mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen bis 1 ml der dekantierten Flüssigkeit in 1 ml 1M HCl keinen trüben Niederschlag mehr hervor rief.

Anschließend wurde das Gel vollständig mit Lösung D bedeckt und unter leichtem schwenken so lange entwickelt bis die gewünschte Bandenintensität erreicht war, wobei beachtet werden muss,

dass diese im Folgenden noch leicht zunimmt. Lösung D wurde durch Abschütten und kurzes Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ entfernt, bevor die Reaktion durch eine 10 minütige Inkubation in Stop-Lösung endgültig beendet wurde. Die Dokumentation erfolgte mit einem handelsüblichen Flachbettscanner.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A	20 % (v/v) Sibernitrat
Lösung B	0,36% (w/v) NaOH
Lösung C	21% (v/v) Lösung B; 1,4% (v/v) 25%ige Ammoniak-Lösung; 4% (v/v) Lösung. A (erst direkt vor Verwendung ansetzen!)
Lösung D	0,005% (w/v) Zitronensäure; 0,019 % (v/v) Formaldehyd
Stop-Lösung	0,5% (v/v) Ethanolamin; 2% (v/v) Essigsäure
DTT-Lösung	5 mg/l DTT 0,0005% (w/v) DTT
HCl	1 M HCl

2.4.4.4 Deep purple™

Der Farbstoff *Deep Purple™ total protein stain* von GE Healthcare (Wessling, Deutschland) wurde verwendet um Proteine in Acrylamidgelen und auf PVDF Membranen zu färben. Beim Transfer mittels *Western blot* auf PVDF Membranen ist es entscheidend diese für 20 bis 60 Sekunden in 100% Methanol zu aktivieren. Als kompatibel mit dem LI-COR Odyssey®-Scanner hat sich die PVDF Membran Immobilon®-FL von Millipore erwiesen, die Porablot PVDF Membran von Machery-Nagel war hingegen weniger geeignet, da die Eigenfluoreszenz deutlich höher war.

Zum Färben des Gels nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese wurde dieses in eine saubere Plastikbox überführt und kurz mit Wasser gewaschen. Dann wurde das Gel mit Lösung A bedeckt und die Proteine für mindestens eine Stunde bei RT auf einem Schüttler im Gel fixiert und dieses angesäuert. Die eigentliche Färbung erfolgte ebenfalls für 1 Stunde, bei RT auf dem Schüttler. Dafür wurde Lösung A gegen *deep purple™* getauscht, welches direkt vor Verwendung im Verhältnis 1:200 in Borat Puffer verdünnt wurde. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Waschpuffer C gewaschen und mit dem LI-COR oder Typhoon® Scanner visualisiert.

Nach erfolgtem *western blot* wurde die PVDF Membran für 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen (RT, auf dem Schüttler). Die Membran wurde mit *deep purple™* gefärbt, welches in einem Verhältnis von 1:400 frisch in Borat Puffer verdünnt wurde. Die Membran wurde dafür für 15 bis 30 Minuten mit leichtem schütteln bei RT inkubiert. Dann wurde die Färbelösung gegen Lösung A getauscht und für 5 Minuten inkubiert. Hierbei färbte sich die Membran grün. Anschließend wurde mit 100% Ethanol gewaschen bis die grüne Färbung wieder verschwunden war. Die Membran kann nun direkt gescannt (Odyssey® oder Typhoon®) oder geblockt und mit spezifische Proteine detektiert werden, dabei können die sekundären Antikörper von LI-COR verwendet werden, die im 800 nm Kanal detektiert werden, während *deep purple™* bei 700 nm sichtbar wird. (siehe auch 2.4.6)

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Lösung A	15% (v/v) Ethanol, 1% (w/v) Zitronensäure
Borate Puffer	0,62% (w/v) Borat, pH auf 10,5 mit NaOH
Waschpuffer C	15% (v/v) Ethanol

2.4.4.5 CyDye DIGE Fluors

Mit den *CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for ETTAN DIGE* von GE Healthcare werden Proteine vor der elektrophoretischen Auftrennung markiert, dabei binden die Farbstoffe (cy2, cy3 und cy5) kovalent an die in den Proteinen enthaltenen Lysinen. Da es sich um eine Minimalmarkierung handelt wird nur ein geringer Teil der Lysine markiert, so dass der Einfluss auf die Proteineigenschaften in der elektrophoretischen Auftrennung sowie Massenspektrometrie gering ist.

Die Farbstoffe wurden in DMF gelöst und auf eine Konzentration von 1 mM gebracht und bei - 20°C gelagert. Pro 50 µg Protein wurden 400 pmol Farbstoff eingesetzt, dafür wurde die Stammlösung zunächst mit dem 1,5 fachen Volumen DMF verdünnt und 1 µl zur Probe gegeben. Die Proben wurden für 30 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. 1 µl Lysin wurde zugegeben, um ungebundenen Farbstoff abzufangen und für 10 min, im Dunkeln und auf Eis inkubiert.

Die Visualisierung erfolgte mit dem Typhoon Scanner (Amersham):

Cy2 Anregung 488 nm, Detektion 515 bis 513 nm

Cy3 Anregung 570 nm, Detektion 560 bis 580 nm

Cy5 Anregung 670 nm, Detektion 655 bis 685 nm

Lösungen	Zusammensetzung
<i>CyDye DIGE Fluors</i>	1 mM in DMF (high quality anhydrous)
Lysin	10 mM L-Lysin

2.4.5 2D-Gelelektrophorese

Die zwei dimensionale (2D) Auftrennung von Proteinen ist eine wichtige Technik um komplexe Proteingemische, wie ganze Proteome, genauer zu untersuchen. Die grundlegende Technik wurde bereits 1975 entwickelt und im Folgenden, sowie durch die kommerzielle Verfügbarkeit der Komponenten stark vereinfacht (O'Farrell, 1975; Friedman, Hoving und Westermeier, 2009; Görg *et al.*, 2004). Die erste Dimension stellt dabei eine isoelektrische Fokussierung in einem Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten dar. Es wird eine Spannung angelegt und die Proteine wandern in dem Gel bis sie ihren isoelektrischen Punkt (IP) erreicht haben und folglich keine Nettoladung mehr besitzen, da sich positive und negative Ladungen ausgleichen. Die zweite Dimension stellt eine SDS-PAGE dar (siehe auch 2.4.3.1), hierbei werden die Proteine annähernd unabhängig von Ladung und

annähernd ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Einige posttranslationale Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen haben einen deutlichen Einfluss auf den PI, nicht aber das Molekulargewicht eines Proteins und lassen sich daher gut über die 2D-Gelelektrophorese visualisieren.

2.4.5.1 Probenvorbereitung und Markierung

In dieser Arbeit sollte mit der 2D-Gelelektrophorese die Frage adressiert werden, ob die *cry3* Mutante oder die Überexpressionslinie ein anderes Chloroplastenproteom aufweist als der Wildtyp. Für diese Fragestellung bietet sich die Verwendung der *CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for ETTAN DIGE* von GE Healthcare an (2.4.4.5). *DIGE* steht dabei für *difference gel electrophoresis*, also Differenz-Gelelektrophorese. Insgesamt gibt es drei Farbstoffe: cy2, cy3 und cy5. Da cy2 etwas abweichende Eigenschaften hat wird er zur Markierung des internen Standards verwendet, das ist eine Mischung aus allen im Experiment vorkommenden Proteinextrakten, hier waren dies jeweils 6 Chloroplastenproteinextrakte der *cry3* Mutante und des Wildtyps Nossen oder von *cry3ox* und Ler. Jeweils 3 Proben der Mutante bzw. Überexpressionslinie wurden mit cy3 und die anderen 3 mit cy5 markiert, die Wildtypen erhielten den jeweils verbliebenen Farbstoff. Durch diese Technik fällt in der Auswertung auf, wenn Unterschiede durch einen Farbstoff ausgelöst wurden. Dadurch konnte auch ein Fehler im verwendeten Protokoll und eine interessante Autofluoreszenz von Chloroplastenproteinen (möglicherweise auf die Anwesenheit sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zurück zu führen) gefunden werden.

Vor der Markierung wurden 250 µg der Chloroplastenproteine (siehe 2.4.1.8.1) mit TCA-Aceton präzipitiert (siehe 2.4.1.2) um störende Bestandteile wie Chlorophyll und andere Farbstoffe zu entfernen. Die Pellets wurden in 100 µl Rehydrationspuffer (RHB) bzw. Markierungspuffer (MB) (wenn Markierung mit CyDyes gewünscht ist) aufgenommen und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde das verbleibende Pellet im Ultraschallbad gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mittels Amidoschwarz bestimmt (siehe 2.4.2.1). Die Proben konnten nun mit den CyDyes markiert werden, wie unter 2.4.4.5 beschrieben, oder direkt isoelektrisch Fokussiert werden.

Wie in Abbildung 6.5 dargestellt wurde deutlich, dass die Anwesenheit von DTT die Effizienz der Markierung mit den CyDyes stark negativ beeinflusst. Gleichzeitig wurde deutlich, dass die Proteinextrakte auch nach TCA/Aceton Fällung unterschiedlich starke Fluoreszenzen in den für die Farbstoffe cy2, cy3 und cy5 verwendeten Kanälen zeigten. Auch nach Phenolextraktion (siehe 2.4.1.3) der Proteine blieb diese Fluoreszenz, besonders im Kanal für cy5. Wurden die Proben allerdings ohne das Vorhandensein von DTT mit den CyDyes markiert, war diese Hintergrundfluoreszenz schwach genug, um die Auswertung nicht maßgeblich zu stören. Daher

wurden im Folgenden die TCA/Aceton Pellets in LB resuspendiert, wenn die Proben mit den CyDyes markiert werden sollten.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
RHB	8 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% CHAPS; 260 mM DTT, 1,6% ASB-14
LB	8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff; 4% CHAPS, 30 mM Tris-HCl ;1,6% ASb-14; pH 8,5

2.4.5.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung der Proteinproben erfolgte mit reayStrip™ IPG-Streifen von Bio-Rad (München) über einen pH Gradienten von 3 bis 10. Die Streifen hatten eine Länge von 11 cm und ein maximales Fassungsvermögen von 200 µl was damit das jeweilige Probenvolumen bestimmte. Typischerweise wurden 50 µg der Chloroplastenproteine in RHB bzw. LB eingesetzt, 1 µl der Ampholyte wurde zugegeben und die Probe mit RHB auf 200 µl aufgefüllt. Zur Fokussierung wurde ein Protean IEF System von Bio-Rad verwendet. Die Probe (200 µl) wurde in den IEF Einsatz (*focusing tray*) pipettiert und der reayStrip™ IPG-Streifen blasenfrei aufgelegt. Um eine Verdunstung der Probe und damit Austrocknen zu verhindern wurde der Strip mit 1 ml Mineralöl (Coverfluid) überschichtet.

Der IEF-Einsatz wurde der Herstelleranweisung entsprechend in die Protean-IEF-Kammer (Protean IEF cell) gestellt und das Programm gestartet. Bevor die eigentliche isoelektrische Fokussierung starten konnte, musste der Strip die Flüssigkeit aufnehmen, dies wird als Rehydratisierung bezeichnet und dauerte 18 Stunden. Nach der Rehydratisierung wurden leicht angefeuchtete Stückchen Filterpapier zwischen die Elektroden und den IPG-Streifen gelegt, diese nahmen CyDyes auf die nicht an Proteine gebunden waren sowie andere störende Substanzen. Erst danach wurde für 15 min eine Spannung von 250 V angelegt, gefolgt von einem langsamen *ramping* über 2,5 Stunden auf 8000 V. Die eigentliche IEF erfolgte mit 20000 V-hr mit maximal 8000 V und einer maximalen Stromstärke von 50 µA pro IPG-Streifen. Nach Abschluss der Fokussierung wurde die Spannung auf 500 V gehalten um ein Diffundieren der Proben im IPG Streifen zu verhindern bis dieser entnommen wurde.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
RHB	8 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% CHAPS; 260 mM DTT, 1,6% ASB-14
Ampholyte	Bio-Lyte 3/10 von BioRad

2.4.5.3 Äquilibration und SDS-PAGE

Die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese stellt wie bereits erwähnt eine SDS-Page dar. Dafür muss der IPG-Streifen nach der IEF zunächst in Puffer mit SDS äquilibriert werden. Zusätzlich

wurden in diesem Schritt die Sulfhydrylgruppen der Cysteine mit DTT reduziert und anschließend mit Iodacetamid alkyliert. Eine Neubildung von Disulfidbrücken wird damit weitestgehend verhindert, was wiederum die Bildung von vertikalen Streifen in den 2D-Gelen minimiert (Görg *et al.*, 1987; Görg *et al.*, 2004).

Die IPG Streifen wurden vorsichtig mit Filterpapier abgetupft und gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült, um das Mineralöl (mit diesem war er während der IEF zum Schutz vor Verdunstung überschichtet) zu entfernen. Der Streifen wurde für jeweils 10 min in Äquilibrationpuffer I und dann direkt in Äquilibrationpuffer II inkubiert. Das in den Puffern enthaltene DTT und Iodacetamid wurde vor Verwendung frisch eingewogen und in den restlichen Pufferbestandteilen gelöst. Nach erfolgter Äquilibration konnten die IPG-Streifen bei -20°C eingefroren und bis zur SDS-Page gelagert werden, meist über Nacht oder wenige Tage.

Für die zweite Dimension wurden 12%ige Polyacrylamid-Gele mit einer Größe von etwa 12 cm x 7,5 cm immer einen Tag vor Verwendung gegossen, um gelabhängige Unterschiede zu minimieren. Die Glasplatten wurden gründlich mit Aceton und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gereinigt. Auf die untere Glasplatte wurden die *spacer* und Rahmen gelegt, die obere Glasplatte wurde gerade aufgelegt und alles mit Glasspannern fixiert. Zunächst wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ zwischen die Glasplatten gegossen, um die Dichtigkeit zu prüfen. War die Apparatur dicht wurde sie mit Filterpapier getrocknet und etwa 9 ml des 12%igen Trenngels nach Zugabe von APS und Temed eingefüllt. Um eine gerade Gelkante zu erhalten wurde das Trenngel mit 50% (v/v) Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgenommen, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Der äquilibrierte IPG-Streifen wurde ggf. aufgetaut und anschließend blasenfrei auf das 12%ige Polyacrylamid-Gel aufgelegt. Um einen Größenstandard mitzuführen wurden 5 μl des *PageRulerTM prestained protein ladder* (MBI Fermentas) auf ein Stück Filterpapier gegeben und dieses neben den IPG-Streifen gesteckt. Mit 1 ml *low melting* Agarose (in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt) wurden Streifen und Filterpapier fixiert. Um die Lauffront gut verfolgen zu können enthielt die *low melting* Agarose außerdem Bromphenolblau. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für etwa 3 Stunden bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Äquilibrationpuffer I	6 M Harnstoff; 0,375 M Tris HCl pH 8,8; 2% (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 2% (w/v) DTT
Äquilibrationpuffer II	6 M Harnstoff; 0,375 M Tris HCl pH 8,8; 2% (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 2,5% (w/v) Iodacetamid
Trenngel 12%ig	12 % (w/v) Acrylamid; 0,32 % (w/v) Bisacrylamid; 0,37 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS; 0,55 % (w/v) (APS; 0,055 % (v/v) Temed zum Starten Polymerisation)
Low melting Agarose	0,5 % (w/v) low melting Agarose; Bromphenolblau (eine kleine Spatelspitze)
Elektrophoresepuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS

2.4.6 Western blot

Ein spezifischer Nachweis von Proteinen ist mit Hilfe von Antikörpern möglich. Das Zielprotein wird zunächst mit spezifischen primären Antikörpern markiert. Die Antikörper erkennen dabei eine oder mehrere Sequenzen im Protein, diese werden auch als Antigen bezeichnet. Eine Visualisierung und Verstärkung dieses Signals wird durch sekundäre Antikörper erreicht. Diese Antikörper richten sich gegen den Immunoglobulin (Ig) Typ des jeweiligen primären Antikörpers und sind damit für den Wirtsorganismus in dem der primäre Antikörper hergestellt wurde spezifisch. An den sekundären Antikörper ist zudem ein Fluorophor oder ein Enzym gekoppelt, welches den qualitativen und eingeschränkt den quantitativen Nachweis des Zielproteins möglich machte. Ein Reportermolekül kann auch direkt an den primären Antikörper gebunden werden, die Variante mit zwei Antikörpern hat jedoch den Vorteil, dass in der Regel mehrere sekundäre Antikörper an einen Primären binden können, das Signal wird dadurch verstärkt. Zudem kann so ein sekundärer Antikörper zum Nachweis vieler unterschiedlicher primärer Antikörper aus einem Wirtsorganismus (oder nah verwandten Arten) verwendet werden. Zur Immunodetektion wurden hier ausschließlich unmarkierte IgG Antikörper verwendet und damit sekundäre Antikörper gegen das IgG des Wirtsorganismus. Bei dem *Western blot* wurden die Proteine zunächst über ein Polyacrylamid Gel aufgetrennt und im nächsten Schritt auf eine Membran transferiert. Diesen Transfer nennt man *western blot* (Renart *et al.*, 1979; Towbin, Staehelin und Gordon, 1979). Im Prinzip ist eine Immunodetektion von Proteinen auch im Gel möglich, birgt jedoch technische Schwierigkeiten und wird deshalb in der Regel nur für Proteine angewendet bei denen der *Western blot* nicht effizient ist, zum Beispiel weil sie sehr groß sind.

2.4.6.1 Transfer

Ein *Western blot* schließt sich an eine Gelelektrophorese an, in dieser Arbeit wurde er stets nach einer PAGE durchgeführt. Prinzipiell ist ein Transfer auch mit nativen Gelen oder nach anderen Arten der Auftrennung möglich, wobei auf eine einheitliche negative Ladung der Proteine zu achten ist. Beim *Western blot* werden die, durch das SDS negativ geladenen Proteine im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese wird das elektrische Feld nun senkrecht zu Gel und Membran aufgebaut so, dass die Proteine aus dem Gel hinaus und auf die Membran wandern.

Nach erfolgter Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zunächst das Sammelgel entfernt und das verbleibende Trenngel in eine saubere Plastischale überführt, um dort für mindestens 30 min in Transferpuffer inkubiert zu werden. In dieser Zeit wurde dickes Blot Papier (Bio Rad Laboratories GmbH, München) und die Membran zugeschnitten, wenn nicht anders vermerkt, wurde die

Porablot NCP Nitrocellulose Membran (Macherey & Nagel, Düren) verwendet. Sollten die Gesamtproteine mittels *Deep purple™* auf dem *Western blot* sichtbar gemacht werden, wurde die PVDF Membran Immobilon-FL von Millipore verwendet. Während die Nitrocellulose Membran genauso wie das Blot Papier nach dem Zuschnitt direkt in Transferpuffer äquilibriert wurde, musste die PVDF Membran zunächst aktiviert werden, damit anschließend die Proteine gebunden werden können. Dafür wurde die Membran für etwa 20 bis 60 Sekunden in 100% Methanol geschwenkt und erst danach in Transferpuffer überführt.

Für den Transfer wurde die *Mini trans blot® cell* von Bio-Rad (München) gemäß den Herstellerempfehlungen verwendet. Beim Zusammenbau musste darauf geachtet werden, dass das Gel in Richtung Kathode und die Membran in Richtung Anode zeigt, nur so wandern die Proteine im elektrischen Feld auf die Membran. Da während dem Transfer durch die angelegte Elektrizität Wärme entsteht verfügte die Blottingapparatur über ein Kühlelement durch welches eine zu starke Erhitzung des Transferpuffers vermieden wurde. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 350 mA und einer maximalen Stromstärke von 100 V für ca. 60 bis 90 Minuten.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	48 mM Tris-Base; 39 mM Glycin; 0,0375 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol

2.4.6.2 Transfer von *Phos-tag™* SDS Polyacrylamid-Gelen

Zur Untersuchung von Phosphorylierungen wurden *Phos-tag™* SDS Polyacrylamid-Gele verwendet (siehe 2.4.3.2). Der Transfer erfolgte auf die *low fluorescent* PVDF Membran (Machery-Nagel, Düren), die Membran wurde aktiviert indem sie für 20 Sekunden in 100% Methanol geschwenkt wurde, nachfolgend wurde sie für 30 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Der für den *Western blot* eingesetzte Transferpuffer enthielt 0,1% SDS und das *Phos-tag™* Gel wurde vor Transfer zunächst für 10 min in diesem Puffer mit 1 mM EDTA und dann 15 min ohne EDTA inkubiert. Der Transfer erfolgte in der *Mini trans blot® cell* von Bio-Rad (München) bei 100 V für 60 bis 90 Minuten. Die Detektion erfolgte mit ECI (siehe 2.4.6.4).

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	48 mM Tris-Base; 39 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol
EDTA-	0,5 M EDTA

2.4.6.3 Immunodetektion mit LI-COR Odyssey®

Nach erfolgreichem *Western blot* wurden alle Gelreste von der Membran entfernt und die Membran in Transferlösung gewaschen. Zum Blocken wurde die Membran für 1 Stunde bei RT auf einem Schüttler (50 bis 100 rpm) in TBS mit 5% [w/v] Milchpulver inkubiert. Die im Milchpulver enthaltenen Proteine binden an die freie Membran und verhindern dadurch die unspezifische

Bindung von Antikörpern (ein alternatives Blocking-Reagenz ist BSA und wurde getestet wenn der Hintergrund sehr hoch oder das spezifische Signal sehr schwach war). Alternativ wurde die Membran in TBS mit 5% [w/v] Milchpulver über Nacht bei 4°C und am nächsten Morgen 10 min bei RT auf dem Schüttler (50 bis 100 rpm) inkubiert.

Das Milchpulver wurde durch dreimaliges Waschen (10 min, RT, 50 bis 100 rpm) der Membran in TBS-T entfernt, bevor die Membran für 1 Stunde mit dem primären Antikörper in TBS-T inkubiert wurde (RT, 50 bis 100 rpm). Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper sind 2.1.8 zu entnehmen. Reste der Antikörper wurden durch dreimaliges waschen (10 min, RT, 50 bis 100 rpm) mit TBS-T entfernt, bevor die Inkubation mit einem zweiten primären oder ein bzw. zwei sekundären Antikörper in TBS-T mit 5% [w/v] Milchpulver erfolgte (45 min, RT, 50 bis 100 rpm). An die sekundären Antikörper sind spezielle Fluorophore gekoppelt die bei 689 bzw. 778 nm angeregt werden (IRDye 700 und IRDye 800). Die Emission wird im Odyssey® Scanner erfasst und ermöglicht die gleichzeitige Detektion von zwei primären Antikörpern. Die Membran wurde zweimal mit TBS-T und einmal in TBS gewaschen (RT, 50 bis 100 rpm), bevor die Membran auf dem Odyssey® Scanner von LI-COR gescannt wurde.

Bei Untersuchungen am Detektionslimit oder Quantifizierungen muss bedacht werden, dass pflanzliche Proteinextrakte, besonders aus grünem Material, mitunter eine sehr deutliche Autofluoreszenz im Anregungsbereich des IRDye 700 zeigt. Für Quantifizierungen wurde daher bevorzugt der IRDye 800 verwendet.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	48 mM Tris-Base; 39 mM Glycin; 0,0375 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol
TBS	20mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
TBS-T	20mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20

2.4.6.4 Immunodetektion mit ECL

Eine andere Variante um spezifisch Proteine auf der Membran nachzuweisen ist die Verwendung der so genannten *enhanced chemilumescence* (ECL), dabei ist an den sekundären Antikörper die Peroxydase aus Meerrettich (HRP) gebunden. In einer enzymatischen Reaktion wird Luminol oxidiert, in dieser chemilumineszenten Reaktion wird Licht frei welches auf einem Film sichtbar gemacht wird. Der Vorgang ähnelt der klassischen Fotografie. Durch die folgende Entwicklung des Films besteht viel Spielraum in der Signalverstärkung, so können sowohl sehr starke Signale (durch kurzes auflegen des Films), als auch sehr schwache Signale (durch lange Exposition) gut detektiert werden.

Das grundlegende Vorgehen entspricht zunächst 2.4.6.3 beim Blocken der Membran wurde in

Abwandlung 7% Milchpulver in TBS-T eingesetzt und der sekundäre Antikörper dementsprechend auch in 7% Milchpulver in TBS-T verwendet. Einzig bei Verwendung des Anti-rat HRP wurde auf Milchpulver bei der Inkubation mit dem sekundären Antikörper verzichtet, da dies zu einer deutlich verminderten Sensitivität führte.

Nach dem abschließenden Waschen der Membran wurde diese mit dem ECL-Substrat für 5 Minuten inkubiert. Verwendet wurden die *ClarityTM Western ECL Substrate* von BIO RAD, auf jede Membran wurden 3,5 ml Luminol/Enhancer Lösung und 3,5 ml der Peroxid-Lösung gegeben und die Membran damit unter leichtem schütteln für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die feuchte Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschweißt um ein austrocknen zu verhindern. Die nachfolgenden Schritte wurden im Dunkelraum unter sehr schwachem Rotlicht durchgeführt, da der empfindliche Film nur minimalen Lichtmengen ausgesetzt werden darf ohne ihn unbrauchbar zu machen. Die eingeschweißte Membran wurde zusammen mit einem Film in die Kassette (*HypercassetteTM* Amersham Biosciences) gelegt. Das Licht welches in der chemilumineszenten Reaktion frei wird, wird nun auf dem Film eingefangen, die Exposition konnte zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden variiert werden, da die Reaktion sehr lange recht stabil ablief, bevor das Substrat zur Neige ging oder die Reaktion durch andere Faktoren inhibiert wurde. Der Film wurde im Entwickler geschwenkt bis Banden der gewünschten Intensität sichtbar wurden (etwa 1 min). Der Film wurde kurz im Waschbad gereinigt und dann für 10 min im Fixierer inkubiert. Nun ist der Film nicht mehr lichtempfindlich und konnte zur Dokumentation eingescannt und weiter aufbewahrt werden.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	48 mM Tris-Base; 39 mM Glycin; 0,0375 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol
TBS	20mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl
TBS-T	20mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20
ECL Substrat	<i>Luminol Enhancer</i> Lösung und Peroxid Lösung von Clarity TM Western ECL Substrate (BIO-RAD, München)
Film	Hyperfilm ECL TM , Amersham Biosciences
Entwickler	Kodak <i>developer & replenisher</i> Sigma-Aldrich GmbH
Fixierer	Kodak fixer Sigma-Aldrich GmbH
Waschbad	destilliertes Wasser mit Essigsäure

2.4.6.5 Strippen der Membran

Um die Antikörper nach erfolgter Immunodetektion wieder von den Zielproteinen zu lösen wurde die Membran für 10 min unter auf einem Schüttler (50 bis 100 rpm) in Stripping-Puffer inkubiert, der Puffer abgeschüttet und erneut für 10 min mit dem Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3mal für je 10 min in TBS gewaschen und konnte dann erneut geblockt und mit

Antikörpern der Wahl inkubiert werden. Es ist zu beachten, dass das Strippen für die ECL-Detektion deutlich besser funktioniert, während es bei der Verwendung des LI-COR Systems nicht möglich war die Fluorophore komplett zu entfernen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Stripping-Puffer	1,5% [w/v] Glycin, 0,1% [w/v] SDS, 1% [v/v] Tween20 pH mit HCl auf 2,2
TBS	20mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl

2.4.7 Size Exclusion Chromatography

Bei der so genannte *size exclusion chromatography* (SEC) oder auch Größenausschluss-Chromatographie können Proteine und Proteinkomplexe (aus mehreren Proteinen oder auch in Verbindung mit Nukleinsäuren, Membranen oder Ähnlichem) gelfrei aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Säule ist unabhängig von der Ladung der Proteine, ausschlaggebend ist das hydrodynamische Volumen. Also die Größe die ein Protein/Proteinkomplex zusammen mit der umschließenden Schicht aus Wassermolekülen oder ggf. Detergenz-Molekülen einnimmt. Große Partikel wandern dabei schneller durch die Säule als kleinere und werden damit früher eluiert. Die kleinen Moleküle und Komplexe werden in der porösen Struktur des Säulenmaterials stärker zurück gehalten.

Zur Auftrennung verwendet wurde die Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Europe GmbH, München), angeschlossen an einen Äkta *purifier* (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Säule (gelagert in 20% EtOH) musste zunächst in H₂O mit 0,02% Natriumazid gewaschen und im Laufpuffer äquilibriert werden bevor sie mit Standardproteinen (Cytochrom C 12,4 kDa, *Carbonis anhydrase* 29 kDa, Albumin 66 kDa, *alcohol dehydrogenase* 150 kDa, *beta Amylase* 260 kDa und *blue Dextran* 2000 kDa) kalibriert wurde. Zur Detektion wurde die Absorption von Proteinen bei 280 nm und speziell für *blue Dextran* bei 630 nm genutzt.

In der Zwischenzeit wurden aus Rosettenblättern der angegebenen *Arabidopsis thaliana* Linien Chloroplasten isoliert und die Proteine nativ isoliert (siehe 2.4.1.8 und 2.4.1.8.2). Eingesetzt wurden 6 bis 12 g Blattmaterial und das entstandene Pellet wurde in 0,5 ml bis 1 ml nativem Extraktionspuffer mit bzw. ohne 0,5% NP-40 und 0,1% Triton X-100 aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay (2.4.2.2) bestimmt. In die SEC eingesetzt wurden im Falle der Proteinextrakte ohne Detergenz etwa 500 µg Protein und etwa 1 bzw. 2 mg für Proteinextrakte mit Detergenz. Die Säule wurde dabei immer mit 0,5 ml über einen Loop geladen. Um sicherzustellen, dass keine größeren Partikel die Säule verstopfen wurde die Proteinprobe vor Verwendung gefiltert (Durapore® PVDF 0.22 µm, Millipore). Die Proben wurden mit dem Probenkollektor in 0,5 ml Fraktionen gesammelt, außerdem wurde die Absorption bei 280 nm, 435 nm und 667 nm detektiert. Die letzteren Absorptionen stellen die Absorptionsmaxima von Chlorophyll dar,

280 nm zielt auf die Detektion von Proteinen.

Die gesammelten Fraktionen wurden beschriftet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Da die Proben mit Detergenz zu einer deutlichen grün Färbung der Säule führten musste diese mit 30% Isopropanol gewaschen werden, bevor sie in 20% Ethanol gelagert wurde.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM DTT und 1x <i>complete Mini, EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) wurden vor der Verwendung frisch zugegeben
Laufpuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, frisch 1 mM DTT (filtriert und entgast)
30% Isopropanol	30% [v/v] Isopropanol, filtriert und entgast
20% EtOH	20% [v/v] Ethanol, filtriert und entgast
Kalibrierung	20 mg von: Cytochrom C, Carbonis anhydrase, Albumin, alcohol dehydrogenase, beta Amylase und 10 mg von blue Dextran in 50 mM Na-Phosphate Puffer pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% Glycerol

2.4.8 Kofaktoren von cry3-GFP

Die Kofaktoren des *in planta* exprimierten cry3-GFP sollten untersucht werden um heraus zu finden, ob die Kofaktoren zu denen des in *E. coli* exprimierten Fusionproteins identisch sind. Dazu wurde cry-GFP über eine ColP angereichert, an den *beads* denaturiert und die Kofaktoren Fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Damit die eluierten Cofaktoren separat betrachtet werden können wurden diese über eine HPLC aufgetrennt.

2.4.8.1 Immunopräzipitation von cry3-GFP

Die Pflanzenextrakte wurden aus adulten (etwa 8 bis 10 Wochen alt), im Kurztag gewachsenen *Arabidopsis thaliana* Rosettenblättern der *cry3* Mutante und der cry3-GFP exprimierenden Linie gewonnen. Je nach benötigter Proteinmenge wurden für jeden Genotyp mehrere Proteinextraktionen und ColPs parallel durchgeführt.

In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden etwa 0,6 g Blattmaterial eingewogen und 350 µl nativem Extraktionspuffer zugegeben, bevor das Blattmaterial mit einem Polytron Mixer zerkleinert wurde. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20000xg, 4°C, 15 min) entfernt und die Proteinkonzentration des Überstands mittels Bradford Assay bestimmt (2.4.2.2).

Zur Präzipitation wurden *GFP-Trap®_M* (Chromotek) verwendet (siehe auch 2.4.9.3), die magnetischen *beads* wurden zunächst dreimal mit nativem Extraktionspuffer gewaschen, pro mg Gesamtprotein wurden 30 µl *beads* verwendet und diese zu den Proteinextrakten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (*protein low binding*, Eppendorf) hinzugefügt. Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die *beads* mit dem Magnet separiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nachdem die saure Elution für cry3-GFP nicht erfolgreich war und auch die Kofaktoren offensichtlich nicht gelöst wurden, wurde TCA-Puffer zur Elution verwendet. Die *beads* wurden für 1 Stunde auf Eis und schüttelnd mit TCA-Puffer inkubiert, bevor die *beads* resuspendiert und zentrifugiert wurden (20000xg, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und zur weiteren fluorimetrischen Bestimmung bzw. HPLC verwendet, das Pellet welches auch die denaturierten Proteine enthält wurde in SDS Probenpuffer aufgeköcht (10 min), die *beads* magnetisch separiert und der Überstand mittels SDS Page und *Western blot* untersucht (siehe 2.4.3.1 und 2.4.6).

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerol und 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim)
Waschpuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,01% NP40
Elutionspuffer sauer	0,2 M Glycine, pH 2,5
TCA-Puffer	7% Trichloressigsäure, 200 mM β-Mercaptoethanol

2.4.8.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem RF-5301 PC Spektrofluorophotometer (Shimadzu) aufgezeichnet. Untersucht wurde zum einen direkt der Überstand der TCA Fällung nach Immunopräzipitation von cry3-GFP (siehe 2.4.8.1) bzw. mit Extrakten der cry3-Mutante als Kontrolle. Zur Hintergrundmessung wurde TCA-Puffer verwendet. Eine weitere Kontrolle stellte heterolog exprimiertes und aufgereinigtes cry3-His-tag dar. Ein Aliquot von 40 pmol des Cryptochroms wurde in TCA-Puffer verdünnt und analog behandelt, der Hintergrund wurde mit dem gleichen Volumen Proteinlagerungspuffer in TCA gemessen, welches auch für die Proben eingesetzt wurde.

Die Standards von (6*R,S*)-5,10-methenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (methenylTHF) chloride (Schircks Laboratories), FAD disodium salt (Sigma), flavin mononucleotide (FMN) monosodium salt dihydrate (AppliChem) und Riboflavin (Duchefa Biochemie B.V.) wurden analog behandelt. Die ca. 1mM stocks wurden dabei direkt vor der Analyse hergestellt. MethenylTHF wurde in 0,1 M HCL, FAD, FMN und MethylenTHF in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und Riboflavin in Methanol gelöst. Um die genaue Konzentration der Standards zu bestimmen wurden diese auf ca. 10 µM verdünnt und die Absorptionsspektren mit dem UV-2401 PC Spectrophotometer (Shimadzu) aufgezeichnet, um die tatsächliche Konzentration anhand des Absorptionskoeffizientens zu bestimmen. Die Fluoreszenzspektren wurden mit 100 nM Standards aufgezeichnet. Zur Verdünnung wurden die gleichen Substanzen wie zur Messung des Hintergrunds verwendet.

Um die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzspektren zu überprüfen wurden Aliquots der entlassenen Kofaktoren auf einen pH von etwa 2,5 und 7,5 eingestellt. Dafür musste zunächst das sehr saure TCA mit NaOH neutralisiert werden und der pH wurde durch Zugabe von Glycin Puffer im Sauren, bzw. durch Tris-HCl im Neutralen, stabilisiert. Die finale Pufferzusammensetzung der Proben war damit 3,4% TCA, 100 mM β-Mercaptoethanol, 275 mM NaOH und 89 mM Glycinpuffer pH 2.5 bzw. 450 mM Tris HCl pH 7.5.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10% Glycerol und 1x complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim)
TCA-Puffer	7% Trichloressigsäure, 20 mM β-Mercaptoethanol
Proteinlagerungspuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5, 200 mM NaCl, 10% Glycerol
NaOH	5 M NaOH
Glycine	0,2 M Glycin HCl Puffer pH 2,5
Tris-HCl	1 M Tris-HCl pH 7,5

2.4.8.3 Reversed phase HPLC

Mit der *reversed phase high pressure liquid chromatographie* (HPLC) wurden die freigesetzten Cofaktoren von cry3-GFP und cry3-His-tag bzw. die Standards (FAD, MethenylTHf, MethylenTHF, FMN und Riboflavin) mit einem linearen Methanolgradienten (60% bis 80%), wie von Moldt *et al.* und Song *et. al* beschrieben (Moldt *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2006), in Anwesenheit von 200 mM β -Mercaptoethanol eluiert.

Die aus cry3-GFP bzw. cry3-His-tag extrahierten Cofaktoren wurden mit NaOH und Phosphatzitratpuffer auf einen pH von 2,5 gebracht und filtriert (Durapore® PVDF 0.22 μ m, Millipore). Anschließend mit Methanol versetzt (finale Konzenration 20% (v/v) MeOH). Zur Auftrennung wurde eine Nucleosil 100-10C18 Säule (Macherey-Nagel) verwendet die an den ÄKTapurifier (GE Heathcare) angeschlossen war.

Während zur Detektion der Standards die im Gerät integrierte Absorptionsmessung bei 295 nm, 360 nm und 450 nm genutzt wurde, wurden von den Proben 100 μ l Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden wie beschrieben im RF-5301 PC Spectrofluorophotometer (Shimadzu) gemessen (siehe 2.4.8.3). Zur Hintergrundmessung wurde eine Mischung aus Phosphatzitratpuffer und Methanol (3:7) verwendet, die mit dem Verhältnis während der Elution der Standards vergleichbar war.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Phosphatzitratpuffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 45 mM Zitronensäure, filtriert 0,45 μ m (frisch 200 mM β -Mercaptoethanol)
NaOH	5 M NaOH
Methanol	100% (v/v) Methanol, filtriert 0,45 μ m (frisch 200 mM β -Mercaptoethanol)

2.4.9 Co-Immunopräzipitation

Bei der CoIP werden Proteine mit einem Antikörper an ein Trägermaterial gebunden, im Gegensatz zu einem *pull down* (bei dem aufgereinigtes Protein an einen Träger gebunden und mit einem Zellextrakt inkubiert wird), werden diese Zielproteine direkt aus einem Extrakt heraus gefangen. Zusammen mit dem Zielprotein können andere Proteine oder Nukleinsäuren immobilisiert werden. Der Vorteil an der CoIP ist, dass damit Interaktionen gefunden werden können die bereits in der Zelle ausgebildet wurden. Mögliche Interaktionspartner auf Proteinebene können anschließend zum Beispiel massenspektrometrisch mittels LC-ESI-MS-MS identifiziert werden. Die Antikörper die zur Immunopräzipitation verwendet werden können sich entweder gegen das Zielprotein selbst oder eine Fusion richten. Da die verfügbaren Antikörper gegen cry3 keine besonders gute Spezifität und Affinität aufweisen wurde ein HA und ein GFP tag verwendet.

Bei der Handhabung der verwendeten *beads* zur CoIP hat es sich als sinnvoll erwiesen diese nur mit

abgeschnittenen Spitzen zu pipettieren. Außerdem konnte die Verwendung von *protein low binding tubes* (Eppendorf) die Ausbeute der CoIPs positiv beeinflussen und wurden daher für die kritischen Schritte verwendet (Binden, Waschen, Eluieren). Um möglichst keine *beads* bei der magnetischen Separation zu verlieren wurden diese stets 2 Minuten auf dem Magnet belassen, auch wenn sich die Suspension sofort zu klären schien. Besonders wichtig war dies im Hinblick darauf, dass *beads* mit gebundenem Protein möglicherweise langsamer wandern.

2.4.9.1 Extrakte für die CoIP

In den CoIPs wurde unterschiedliches pflanzliches Blattmaterial eingesetzt. Alle Arbeiten wurden soweit möglich auf Eis oder im Kühlraum (4°C) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (siehe 2.4.2.2).

Erste Untersuchungen wurden mit nativen Gesamtextrakten aus Tabak durchgeführt, welcher mit Agrobakterien transient transformiert wurde und cry3-HA in den infizierten Zellen exprimierte (siehe 2.2.7.4). Die Blattstücke wurden eingewogen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und mit der Zelmühle zu Pulver zermahlen, dabei wurde ein Auftauen der Probe durch regelmäßiges kühlen in flüssigem Stickstoff vermieden. Pro 1 g pulverisiertem Blattmaterial wurde 1 ml CoIP Extraktionspuffer mit 1% NP40 zugegeben. Etwa 250 µl wurden für die CoIP zu 50 µl der mit anti-HA Antikörpern vernetzten *beads* (*cross linked*) gegeben. Die Proteinkonzentration von Probe und Kontrolle wurden dabei mit CoIP Extraktionspuffer mit 1% NP-40 angeglichen.

Für lösliche, native Gesamtextrakte aus *Arabidopsis thaliana* wurde Blattmaterial von im Kurztag gewachsenen Pflanzen entsprechender Genotypen, die cry3-HA bzw. cry3-GFP exprimierten und den dazugehörigen Wildtypen, mit Schere oder Skalpell abgetrennt. Die Blätter wurden mit dem Skalpell grob zerkleinert und in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) eingewogen, zu 1 g Blattmaterial wurde 500 µl CoIP Extraktionspuffer ohne NP-40 gegeben. Für die nachfolgende CoIP mit dem HA-Antikörper wurden 0,5% NP 40 direkt vor der Inkubation mit den *beads* hinzugefügt. Bei Verwendung der *GFP-Trap®_M* (Chromotek) war dies nicht nötig. Bis zu 750 µl (entspricht 2,5 bis 3,2 mg Protein) der löslichen Gesamtproteine wurden in eine CoIP eingesetzt, dafür wurden 75 µl der mit Anti-HA gekoppelten und nicht gecrosslinkten *beads* (7,5 µg IgG anti-HA) bzw. 95 µl *GFP-Trap®_M* (Chromotek) (pro 1 mg Gesamtprotein wurde 30 µl *beads* eingesetzt) verwendet. Die Proteinkonzentration von Probe und Kontrolle wurde mit CoIP Extraktionspuffer mit bzw. ohne 0,5% NP-40 angeglichen.

Chloroplastenproteintextrakte wurden wie in 2.4.1.8 und 2.4.1.8.2 beschrieben aus 4,5 g Blattmaterial hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienten adulte, im Kurztag gewachsene Pflanzen der entsprechenden Genotypen die cry3-HA bzw. cry3-GFP exprimierten, sowie die dazugehörigen

Wildtypen.

Ein Gesamtproteinextrakt aus den Chloroplasten wurde durch Verwendung von 0,5 % NP-40 im CoIP Extraktionspuffer hergestellt. Der Chloroplastengesamtextrakt wurde in Verbindung mit Anti-HA *beads* verwendet, dabei wurden 50 bis 100 µl der *beads* (entspricht 5 bis 10 µg IgG) mit 1,5 bis 3 mg Chloroplastenproteinextrakt inkubiert. Die Proteinkonzentration in Probe und Kontrolle wurde durch Zugabe von CoIP Extraktionspuffer mit 0,5% NP-40.

Lösliche Chloroplastenproteine wurden mit und ohne NP-40 hergestellt. In die CoIP wurden etwa 100 bis 220 µg lösliche Chloroplastenproteine in einem Volumen von 350 µl eingesetzt. Hinzu kamen 55 µl der *GFP-Trap®_M* (Chromotek) bzw. 50 µl der *Dynabeads* mit gekoppeltem Anti-HA (5 µg).

Lösungen	Zusammensetzung
CoIP Extraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10%Glycerol, 1 mM DTT und 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben. Detergenz siehe Text.
nativer Extraktionspuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben.

2.4.9.2 Anti-HA CoIP

Zur Coimmunopräzipitation (CoIP) wurde das *Dynabeads® Protein G immunoprecipitation Kit* (Invitrogen) verwendet. Dabei handelt es sich um *beads* die mit Hilfe eines Magnets separiert werden können, um eine vollständige Retention der *beads* zu gewährleisten. Die Oberfläche der *beads* ist mit einem rekombinanten Protein G überzogen an welches kein Albumin bindet. Laut Herstellerinformation binden 100 µl *Dynabeads* Protein G ca. 25-30 mg IgG. Es gibt die Möglichkeit einen *crosslink* herzustellen, so dass die Antikörper kovalent an Protein G gekoppelt wird und nicht mit den Zielproteinen der CoIP eluiert werden. Dadurch kann verhindert werden, dass die große Menge Antikörper die Detektion der Zielproteine stört. Andererseits kann es auch dazu führen, dass ein Teil der Antikörper inaktiv ist. Daher wurden CoIPs mit und ohne *crosslink* durchgeführt, das Ergebnis wurde davon nicht merklich beeinflusst.

2.4.9.2.1 Binden der Antikörper an die Protein G *Dynabeads*

Die *Dynabeads* wurden durch Rotation für etwa 5 min resuspendiert. Pro Ansatz wurden 50 µl der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Der Überstand wurde durch die Verwendung eines Magnets entfernt und die *beads* in 200 µl *AB Binding&Washing Buffer* (Invitrogen) mit Anti-HA (high affinity, Roche) IgG aufgenommen. Initial wurden 0,2 µg Anti HA IgG auf 50 µl *Dynabeads* eingesetzt, im späteren Verlauf haben sich 5 µg Anti-HA IgG auf 50 µl *beads* als geeignet heraus gestellt.

Das Binden der Antikörper erfolgte bei RT und unter Rotation für 10 min. Der Überstand wurde entfernt und die Protein G *Dynabeads*, die nun den Antikörper gebunden haben, mit *AB Binding&Washing* Puffer (Invitrogen) gewaschen.

2.4.9.2.2 Cross-link mit BS3

Der BS3-Stock wurde erst direkt vor Verwendung hergestellt und dieser in Konjugationspuffer auf 5 mM BS3 verdünnt. Die *beads* mit gebundenem Antikörper wurden zweimal mit 200 µl Konjugationspuffer gewaschen, bevor 250 µl der BS3 Lösung (5 mM) zugegeben wurde und der Ansatz für 30 min bei RT und Rotation inkubiert wurde. Zum Stoppen der Reaktion wurden 12,5 µl Stop-Lösung zugegeben und für weitere 15 min wie Oben beschrieben inkubiert. Anschließend wurden die *Dynabeads* mit den vernetzten Antikörper dreimal mit CoIP Extraktionspuffer gewaschen.

Lösungen	Zusammensetzung
BS3-Stock	100 mM BS3 in Konjugationpuffer
Konjugationspuffer	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5; 0,15M NaCl
Stop-Lösung	1 M Tris HCl pH 7,5
CoIP Extraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10%Glycerol, 1 mM DTT und 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben. Detergenz siehe Text.

2.4.9.2.3 Preclear des Lysats

Bei der Verwendung des *Dynabeads® Protein G immunoprecipitation Kits* (Invitrogen) in Verbindung mit Anti-HA IgG gab es die Möglichkeit eines *preclears*, dabei wird der Proteinextrakt zunächst mit *beads* inkubiert an die keine Antikörper gebunden waren. Der *preclear* erfolgte mit 50 µl *beads* auf etwa 2 bis 4 mg Chloroplastenlysat (siehe 2.4.1.8 und 2.4.1.8.2) für 1 Stunde bei 4°C unter Rotation. Die *beads* wurden magnetisch separiert (für 2 min auf dem Magneten) und die ungebundenen Chloroplastenproteine in die CoIP eingesetzt.

2.4.9.2.4 Inkubation und Waschen

Die *beads* wurden mit den Extrakten für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Um eine gute Durchmischung sicher zustellen, wurde ein Rotationsschüttler verwendet. Die *beads* wurden mindestens 3mal mit CoIP Extraktionspuffer gewaschen, wenn nachfolgend die massenspektrometrische Identifikation von Zielproteinen geplant war wurde 7mal gewaschen. Um Proteine die an die Wand der Reaktionsgefäße binden nicht mit zu eluieren, wurde das Reaktionsgefäß gewechselt. Bei 3mal Waschen fand der Wechsel vor dem letzten Waschschrift und bei 7mal Waschen nach dem 4. Waschschrift statt.

Lösungen	Zusammensetzung
CoIP Extraktionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10%Glycerol, 1 mM DTT und 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben. Detergenz siehe Text.

2.4.9.3 Anti-GFP CoIP

Verwendet wurde *GFP-Trap®_M* (Chromotek), dabei handelt es sich um den antigenbindenden Teil eines Anti-GFP Antikörpers aus Alpaka der an magnetische *beads* kovalent gekoppelt ist. Die Antikörper aus Kamelen produzieren unterschiedliche Arten von IgG Antikörpern: IgG1, IgG2 und IgG3. Während es sich bei IgG1 um einen gewöhnlichen Antikörper mit schweren und leichten Ketten handelt, fehlen bei den anderen beiden Typen die leichten Ketten. Die Antigen Bindungsstelle wird als Nanobody oder V_HH bezeichnet. Mit etwa 15 kDa sind die V_HHs vergleichsweise klein und zeichnen sich auch durch eine sehr gute Stabilität und Spezifität aus (Produktinformation Chromotek). Da bei der *GFP-Trap®_M* die Antikörper bereits an die *beads* gekoppelt sind, ist die Handhabung sehr einfach und schnell. Dabei können 10 µl *GFP-Trap®_M* Suspension etwa 0.25 – 0.5 µg GFP binden.

2.4.9.3.1 Äquilibrierung

Die *GFP-Trap®_M* wurden kurz gevortext und das benötigte Volumen entnommen, pro CoIP wurden 30 bis 55 µl der Suspension eingesetzt. Die *beads* wurden 3mal mit je 500 µl eiskaltem nativem Extraktionspuffer gewaschen und magnetisch separiert.

Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben.

2.4.9.3.2 Binden und Waschen

Die Extrakte in nativem Extraktionspuffer wurden zu den äquilibrierten *GFP-Trap®_M* gegeben und für 1 Stunde, bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die *beads* wurden mindestens 3mal mit Waschpuffer gewaschen, wenn nachfolgend die massenspektrometrische Identifikation von Zielproteinen

geplant war wurde 7mal gewaschen. Um unspezifisch an die Wand des Reaktionsgefäßes gebundene Proteine nicht zu analysieren wurden die *beads* einmal in ein frisches Gefäß überführt (1,5 ml Eppendorf, *protein low binding*). Bei 3mal Waschen vor dem letzten Waschschrift und bei 7mal Waschen nach dem 4. Waschschrift.

Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben.
Waschpuffer	10 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,01% NP-40

2.4.9.4 Elution

Um das Zielprotein zu eluieren gibt es unterschiedliche Varianten, empfohlen wird eine Veränderung des pH-Wert welche den Antikörper denaturiert und so die Bindung an das Antigen lösen soll. Für die Elution von cry3-HA war dies nicht erfolgreich und eine stöchiometrische Elution war nur durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer möglich.

2.4.9.4.1 Elution Sauer 1

Die *beads* wurden 3mal mit je 10 µl Glycin/HCl eluiert. Die *beads* wurden dabei magnetisch separiert und das abgenommene Eluat wurde durch Zugabe von 2 µl Tris/HCl neutralisiert.

Lösungen	Zusammensetzung
Glycine/HCl	100 mM Glycin mit HCl auf pH 2,8
Tris/HCl	1 M Tris mit HCl auf pH 8,0

2.4.9.4.2 Elution Sauer 2

Die *beads* wurden 2mal für 5 Minuten und bei RT mit je 12,5 µl Glycin/HCl inkubiert, um eine gute Durchmischung sicherzustellen, wurde hierfür ein Schüttler verwendet. Die *beads* wurden magnetisch separiert und das abgenommene Eluat wurde durch Zugabe von 2,5 µl Tris/Hcl neutralisiert.

Lösungen	Zusammensetzung
Glycin/HCl	200 mM Glycin mit HCl auf pH 2,5
Tris/HCl	1 M Tris mit HCl auf pH 10,4

2.4.9.4.3 Elution basisch

Die *beads* wurden mit 20 µl Thiethylamin-Puffer für 10 min inkubiert bevor diese magnetisch separiert wurden. Das abgenommene Eluat wurde mit 3 µl MES neutralisiert.

Lösungen	Zusammensetzung
Thiethylamin-Puffer	0,1 M Thiethylamin, pH ca. 11,8, 0,1% Triton X-100
MES	1 M MES, pH 3,0

2.4.9.4.4 Elution mit SDS Probenpuffer

Die *beads* wurden in SDS Probenpuffer bei 95°C für 5 min aufgekocht und anschließend magnetisch separiert, der Überstand enthielt die eluierten Proteine. Bei Verwendung des HA Epitops wurde 1xSDS Probenpuffer verwendet, bei den *GFP-Trap®_M* entsprechend der Bedienungsanleitung 2xSDS Probenpuffer.

Lösungen	Zusammensetzung
5xSDS Probenpuffer	225 mM Tris-HCl, pH 6,8; 250 mM DTT; 5 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.9.5 Nukleinsäuren-Bindung von cry3-GFP

Neben anderen Proteinen besteht auch die Möglichkeit, dass cry3 mit Nukleinsäuren interagiert. Auch diese Frage wurde mittels ColPS mit den *GFP-Trap®_M* adressiert.

Untersucht wurden Chloroplastenextrakte aus 7,5 g Blattmaterial im Kurztag gewachsener cry3-GFP exprimierender *A. thaliana* und dem dazugehörigen Wildtyp Ler, sowie native Gesamtextrakte aus 0,6 bis 0,7 g Blattmaterial der gleichen Pflanzen (siehe 2.4.9.1.). Hegestellt wurden die Extrakte in nativem Extraktionspuffer. Die ColP wurde genau wie unter 2.4.9.3 beschrieben durchgeführt. Vor der Elution wurden die *beads* aufgeteilt, 1/5 wurde mit SDS-Probenpuffer eluiert (15 µl), siehe 2.4.9.4.4. Der Rest der *beads* wurde in 25 µl nukleasefreiem H₂O aufgekocht, die *beads* magnetisch separiert und der Überstand bei -70°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

Lösungen	Zusammensetzung
nativer Extraktionspuffer	10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1x <i>complete Mini</i> , <i>EDTA-free</i> Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim) vor der Verwendung zugegeben.
Waschpuffer	10 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,01% NP-40

2.4.10 Massenspektrometrische Proteinidentifikation

Die Identifikation von unbekannten Proteinen stellt eine technische Herausforderung dar, Varianten wie der Edmann Abbau ist sehr fehleranfällig und benötigt größere Mengen reines Protein, ist aber die einzige Variante bei der tatsächlich die Aminosäuresequenz bestimmt wird. Bei der verwendeten Massenspektrometrie (MS) wurde das zu untersuchende Protein zunächst durch

einen Verdau mit Trypsin in kleinere Peptide aufgespalten und schließlich deren Masse bestimmt. Dabei wurden zwei verschiedene Massenspektrometer mit unterschiedlichen Arten der Ionisierung und Massenspektrometrie verwendet: die Matrix unterstützter Desorption/Ionisation Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) bzw. die Elektrospray Ionisation Flugzeitanalyse (ESI-TOF).

2.4.10.1 Maldi TOF MS bzw. MS/MS

Zur Identifikation von unbekannten Proteinen in 2D Gelen wurde die Maldi TOF MS bzw. MS/MS verwendet. Dieses massenspektrometrische Verfahren wurde bereits Ende der 1980er Jahren entwickelt (Karas und Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988) und stellt seitdem ein essentielles Werkzeug für Proteomanalysen dar (Bonkuand Humeny, 2001; Hortin, 2006; Sheffield und Gavinski, 2003). Um die Proteine aus dem Gel heraus zu lösen und mittels Maldi TOF zu charakterisieren wurden diese zunächst im Gel verdaut, wozu das Enzym Trypsin verwendet wurde. Die Peptide wurden anschließend mit einer α Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Matrix auf einen Probenhalter (*target*) geladen und in einem MALDI-TOF-TOF Ultraflex II von Bruker Daltonik (Bremen) untersucht.

2.4.10.1.1 Trypsin Verdau und Laden des *targets*

Das gewünschte Stück eines mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gels wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (*protein LoBind Microcentrifuge Tubes*, Eppendorf) überführt. Das Gelstück wurde mit Waschlösung bedeckt (für eine Größe von 2 mm x 2 mm reichten hierfür 200 μ l) und bei 37°C für 30 min unter kontinuierlichem schütteln entfärbt. Bei sehr stark gefärbten Gelstücken wurde die Waschlösung gegen frische getauscht und erneut wie beschrieben inkubiert. Anschließend wurde die Waschlösung vollständig abgenommen und die Gelstücke in einem Konzentrador (*Speed Vac*, Eppendorf) bei 30°C getrocknet, dies dauerte etwa 30 bis 40 Minuten.

Zu dem getrockneten Gelstück wurden 18 μ l Trypsin-Lösung zugegeben und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Trypsin-Lösung, die in dieser Zeit nicht ins Gel aufgenommen wurde, wurde entfernt und der Verdau fand über Nacht (18Stunden) bei 37°C statt. Durch die Zugabe von 18 μ l Diffusionslösung wurden die Peptide aus dem Gelstück gelöst, unterstützt wurde dies durch ein Ultraschallbad in welchem die Proben für 45 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Flüssigkeit wurde komplett in neue 0,5 ml Reaktionsgefäß (*protein LoBind Microcentrifuge Tubes*, Eppendorf) überführt und diese im Konzentrador (*Speed Vac*, Eppendorf) bei 45°C getrocknet bis keine Flüssigkeit mehr sichtbar war, dies benötigte etwa 2 Stunden. Die Pellets wurden in 3 μ l Matrix aufgenommen und auf ein *target* geladen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Waschlösung	200 mM NH_4HCO_3 ; 50% (v/v) Acetonitril
Trypsin-Lösung	12 ng/ μl Trypsin (Sequencing Grade Modified von Promega) in Trypsin Resuspension Puffer (Promega)
Diffusions-Lösung	10% (v/v) Acetonitril; 1% (v/v) Trifluoressigsäure
Matrix	gesättigte Lösung von α Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure Matrix für MALDI (Bruker Daltonics) in 33,3% (v/v) Acetonitril und 0,066% (v/v) Trifluoressigsäure

2.4.10.1.2 Massenspektrometrie

Das UltraFlex MALDI-TOF-TOFII (Bruker Daltonics, Bremen) wurde mit einem Stickstofflaser (MNL 106-PD/50 Hz mit 337 nm, 3 ns Puls und 50 HZ) wurde verwendet, um die aus Gelstücken extrahierten Peptide zu identifizieren. Die tägliche Kalibrierung erfolgte mit dem *Peptide Calibration Standard II* (Größenbereich ca. 700-4000 Da) von Bruker. Zur internen Kalibrierung der Proben wurden die autokatalytischen Fragmente von Trypsin verwendet, welches zum Verdau der Proteine genutzt wurde und außerdem die menschlichen Keratinpeptide, da es sich dabei um eine sehr schwer vermeidbare Kontamination handelt.

Bei der MALDI-TOF-MS werden die mit der Matrix kokristallisierten Peptide durch einen Laserstrahl ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Peptide fliegen durch ein Hochvakuum und treffen schließlich auf einen Detektor, die Flugzeit (*time of flight*) wird gemessen und als Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) angegeben. Da jedes Peptid eine positive Ladung trägt korreliert dieses Verhältnis also direkt mit der Größe eines Peptids. Da mehrere Peptide gleichzeitig ionisiert werden ergeben sich so genannte Massenspektren. Diese Spektren wurden mit der Software FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen) kalibriert, wozu wie bereits erwähnt die bekannten Massen für Keratin und die autokatalytischen Massen von Trypsin verwendet wurden. Nach Kalibrierung wurden die Keratin und Trypsin zugeordneten Peaks aus den Spektren entfernt. Die so erhaltenen Spektren werden als *peptide mass fingerprint* (PMF) bezeichnet. Zur Aufbereitung der Massenlisten für einen Datenbankabgleich und folglich die Identifikation zugehörigen Proteine wurde das Programm BioTools (Bruker Daltonics) verwendet und für den Datenbankabgleich die Mascot Software eingesetzt (www.matrixscience.com). Die PMFs wurden mit der Matrix Science (MSDB) und der SwissProt Datenbank abgeglichen, als Organismen wurden *Arabidopsis thaliana* und *Homo sapiens* gewählt, letzteres zur Identifikation von Kontaminationen. Bei den Suchparametern wurde (1.) eine C-terminale Carbamidomethylierung der Peptide als feste Modifikation ausgewählt (2.) eine N-terminale Acetylierung (3.) eine Oxidation von Methionin als variable Modifikationen (4.) wurde eine *missed cleavage site* (Stelle an der Trypsin nicht geschnitten hat) und (5.) eine Massenabweichung von 50 oder 100 ppm zugelassen. Erfüllte ein angegebener Treffer nur sehr knapp die Kriterien wurde genau darauf geachtet, ob mögliche Modifikationen vorliegen und ob die zugeordneten Treffer möglicherweise in Signalpeptiden liegen, die am

erwarteten Protein nicht mehr enthalten wären. Auch wurden der mögliche pI und das Molekulargewicht mit dem Laufverhalten auf dem zugehörigen 2D Gel verglichen.

War keine eindeutige Identifikation eines Proteins über den PMF möglich wurden die Proben mit MALDI-TOF-MS/MS versucht zu identifizieren. Die daraus erhaltenen Spektren werden als *peptide-fragment-mass-fingerprint* (PFMF) bezeichnet. Zunächst wird wie beim PMF verfahren, einzelne Peptide (welche als Peaks zu erkennen sind) können im verwendeten Massenspektrometer isoliert und in einer Kollisionskammer in die einzelnen Aminosäuren bzw. Gruppen von Aminosäuren fragmentiert werden. Mit Hilfe von komplexen Rechen Algorithmen und dem Datenbankabgleich kann anhand dieser Fragmente die Aminosäuresequenz mit einer hohen Genauigkeit bestimmt werden (Jardine *et al.*, 1992).

2.4.10.2 LC-ESI-MS/MS

Unbekannte Proteine zu identifizieren birgt einige Schwierigkeiten, besonders wenn die Mengen stark limitiert sind. Über CoIPs (siehe 2.4.9) wurde nach Interaktionspartnern von cry3 gesucht, eine vollständige Elution des Cryptochroms war nur über ein Aufkochen in SDS Puffer möglich (In Eluaten die durch eine Verschiebung des pHs ins saure erfolgten wurde auch mittels LC-ESI-MS kein cry3 detektiert und nur geringe Mengen anderer, unspezifischer Proteine). Der SDS-Probenpuffer ist nicht mit der Massenspektrometrie und einem Trypsin Verdau kompatibel. Daher ergaben sich in Abhängigkeit von dem zur Präzipitation verwendeten Epitop, zwei unterschiedliche Verfahren zum Trypsin Verdau.

2.4.10.2.1 Trypsin Verdau

Im Falle des HA Epitops zeigten auch Silber gefärbte Gele der Eluate nur sehr wenig Protein und kaum spezifische Banden, über Konzentratoren (Vivaspin 500 *centrifugal concentrators* MWCO 10 kDA, Sigma-Aldrich) wurde der Puffer ausgetauscht und die Probe anschließend mit Trypsin verdaut, dies wurde in der Proteomic Einrichtung (AG Lingelbach angegliedert) von Nadja Braun unter der Leitung von Dr. Stefan Baumeister ausgeführt.

Bei Verwendung des GFP Epitops ergaben sich größere Mengen an eluiertem Protein und ein komplexeres Bandenmuster. Die Eluate wurden über eine SDS PAGE (12,5% Acrylamidgele) aufgetrennt, wobei gestoppt wurde bevor die Lauffront das Ende des Gels erreichte. Das Gel wurde mit einem Skalpell in Stücke geschnitten, entfärbt und mit Trypsin verdaut wie in 2.4.10.2.1 beschrieben und von Nadja Braun unter der Leitung von Dr. Stefan Baumeister durchgeführt.

2.4.10.2.2 Massenspektrometrie

Die aus dem Trypsin Verdau erhaltenen Peptide wurden an die Massenspektrometrie und Elementaranalytik um Dr. Uwe Linne weitergeleitet. Dort wurde eine Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer zusammen mit einer nanoHPLC-Anlage der Firma Dionex/Thermo (nanoRSLC) verwendet. Über die HPLC wurden die Peptide zunächst ihrer Größe nach aufgetrennt und dann direkt in das Massenspektrometer initiiert. Im Gegensatz zum MALDI TOF erfolgte die Ionisierung der Moleküle hier unabhängig von einer Matrix. Bei der zugrunde liegende Technik der ESI, wurden die Moleküle durch eine feine Kapillare in ein elektrisches Feld vernebelt und ionisiert (Fenn *et al.*, 1989). Die Massenspektrometrie erfolgte analog zu der unter 2.4.10.1.2 für MALDI-TOF MS/MS erläuterten Methode. Die Datenbank wurde dabei nach *Homo sapiens* und *Arabidopsis thaliana* durchsucht.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Kofaktoren von *in planta* exprimiertem cry3

Wie alle Mitglieder der Cryptochromfamilie bindet cry3 Kofaktoren, die für die Perzeption von Licht essentiell sind. Die Identifizierung dieser Kofaktoren fand bisher ausschließlich an rekombinantem Protein statt, welches in *E. coli* oder Insektenzellen exprimiert wurde. Da in Pflanzen Synthesewege für Metabolite vorhanden sind, die von den heterologen Systemen nicht produziert werden, war bisher nicht vollständig klar, ob es sich bei den identifizierten Kofaktoren tatsächlich um die authentischen Kofaktoren des Cryptochroms handelt.

3.1.1 Über Fusion mit GFP kann cry3 aus Pflanzenextrakten angereichert werden

Ein Fusionsprotein von cry3 und GFP wurde unter Kontrolle des 35S Promotors in *Arabidopsis* exprimiert, um die *in planta* an cry3 gebundenen Kofaktoren zu identifizieren. Gleichzeitig wurde die Anwesenheit von cry3 in nativen Protein-Gesamtextrakten bzw. Chloroplastenextrakten überprüft. Die Größe des Fusionsproteins beträgt ca. 92 kDa. Ein spezifisches Signal, welches nur in Pflanzenextrakten auftaucht die cry3-GFP exprimieren, war im *Western blot* bei erwarteter Größe zu beobachten (siehe Abbildung 3.1a). Die Signalstärke in nativen, löslichen Gesamtextrakten und Chloroplastenextrakten war in etwa gleich. Für die Charakterisierung der Kofaktoren wurden

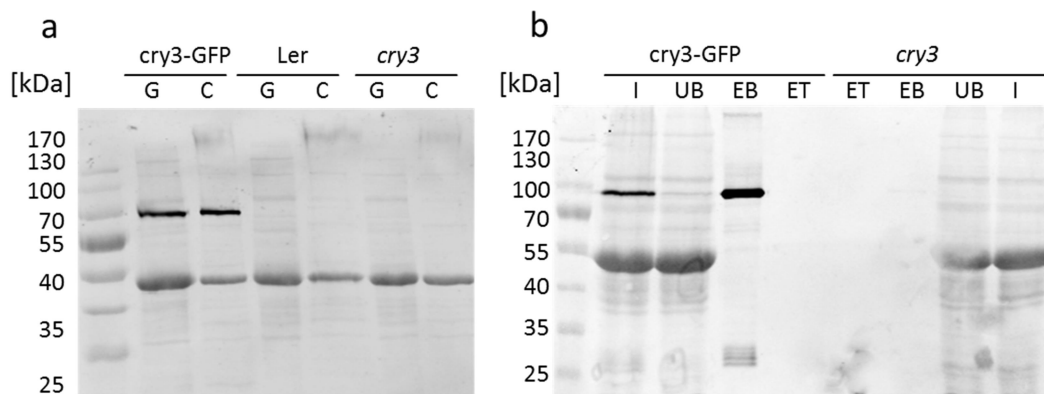


Abbildung 3.1 Anti-GFP Western blots zeigen eine deutliche Anreicherung von cry3-GFP durch die Immunopräzipitation.

a Lösliche, native Gesamtextrakte und Chloroplastenextrakte aus adultem Blattmaterial von *Arabidopsis* Wildtyp (Ler), der cry3 Mutante (cry3) sowie der cry3 Mutante die cry3-GFP exprimiert (cry3-GFP), wurden mittels *Western blot* untersucht. **b** Die Gesamtextrakte von cry3-GFP exprimierenden Pflanzen und der cry3 Mutante wurden mit GFP-Trap® *magnetic beads* (ChromoTek) inkubiert. 1/50 des Inputs (I) und der ungebundenen Proteine (UB) wurden geladen. Die an die *beads* gebundenen Proteine wurden mit 7% TCA denaturiert und der Überstand abgenommen (ET). Verbleibende Proteine wurden durch Aufkochen in SDS-Ladepuffer erneut eluiert (EB) und jeweils 1/10 im *Western blot* untersucht. Ein deutliches Signal für das Fusionsprotein cry3-GFP ist mit dem *goat* anti-GFP (Rockland) und IRDye800CW *donkey anti-goat* (LI-COR Biosciences) bei etwa 95 kDa zu erkennen. Die Visualisierung erfolgte mit dem LI-COR Odyssey® *imaging system*.

möglichst große Mengen des Proteins benötigt. Da die Gesamtextrakte in Bezug auf das Ausgangsmaterial eine höhere Proteinmenge als Chloroplastenextrakte lieferten wurden diese im Folgenden verwendet.

Zur Aufreinigung von cry3-GFP wurde eine Immunopräzipitation mit *GFP-Trap[®]_M* (ChromoTek) durchgeführt (siehe 2.4.9.3). In Abbildung 3.1b ist ein typischer *Western blot* gezeigt, auf dem der Input (I), die ungebundenen Proteine (UB) und die Eluate (EB und ET) mit Anti-GFP detektiert wurden. Zur Freisetzung der Kofaktoren wurde das an die *beads* gebundene cry3-GFP mit TCA denaturiert und von den *beads* separiert. Der so gewonnene Überstand (ET) zeigte im *Western blot* jedoch keine Spuren eines GFP Signals, was auf eine mögliche Aggregation von *beads* und denaturiertem Protein hindeutet. Der sehr niedrige pH sollte eine antikörperabhängige Interaktion der Komponenten unterbinden. Um den Verbleib des Proteins zu überprüfen, wurden die *beads* in SDS-Probenpuffer aufgekocht und magnetisch separiert. Der so erhaltene Überstand (EB) zeigte ein deutliches Signal für das Fusionsprotein. Im Vergleich zum Input fand eine deutliche Anreicherung statt, nur wenig Protein scheint in den Waschschritten verloren gegangen zu sein. Ein Vergleich mit den ungebundenen Proteinen zeigte zudem, dass nahezu alles cry3-GFP aus den Extrakten an die *beads* gekoppelt wurde. In Abbildung 3.1b ist entsprechend in der ‚UB‘ Spur nur eine sehr schwache Bande auf der entsprechenden Höhe zu erkennen.

3.1.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen deuten auf die Bindung eines Folats und Flavins an cry3-GFP hin

Anhand von *Western blots* mit Proteinen bekannter Menge konnte abgeschätzt werden, dass mit der beschriebenen Methode ca. 18 pmol cry3-GFP präzipitiert werden kann. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 180 nM in dem für die Messung benötigten Volumen. Die Konzentration der so freigesetzten Kofaktoren ist zu gering, um diese anhand ihrer Absorptionseigenschaften zu charakterisieren. Es ist jedoch möglich, deren Fluoreszenz zu untersuchen und diese mit kommerziell erhältlichen Standards (MethenylTHF und den Flavinen FAD, FMN und Riboflavin) bekannter Konzentration zu vergleichen. Ein Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenzsignale von Probe und Standards zeigte, dass die anhand von *Western blots* kalkulierte Konzentration von cry3-GFP akkurat war. Außerdem wurden die aus in Pflanzen exprimiertem cry3 eluierten Kofaktoren mit solchen verglichen, die unter annähernd identischen Bedingungen aus cry3-His-tag freigesetzt wurden. Das mit einem His-tag fusionierte cry3 wurde zuvor in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (zur Verfügung gestellt von Richard Porkorny).

Zur besseren Darstellung wurden die Fluoreszenzspektren auf die jeweiligen Fluoreszenzmaxima normiert. In Abbildung 3.2 a und b sind Emissionsspektren bei einer Anregung mit 350 nm sowie die

Exzitationsspektren für eine Emissionswellenlänge von 460 nm dargestellt. In grau sind in Abbildung 3.2a die erhaltenen Spektren für kommerziell erworbenes MethenylTHF gezeigt, welches bereits als Kofaktor in rekombinantem cry3-His-tag identifiziert worden war (Pokorny *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006). Wie zu erwarten zeigten die in blau dargestellten, eluierten Kofaktoren von cry3-His-tag nur geringe Unterschiede zu dem Kurvenverlauf von MethenylTHF. Die Anregung der Proben mit Licht einer Wellenlänge von 350 nm führt zu einer deutlichen Fluoreszenz mit einem Maximum bei etwa 460 nm (Abbildung 3.2a, durchgezogene Linien). Analog dazu zeigt das Exzitationsspektrum für eine Emission von 460 nm ein Maximum bei etwa 350 nm. Zusätzlich jedoch noch ein zweites, kleineres Maximum bei etwa 275 nm, welches ebenfalls in allen Proben auftaucht (Abbildung 3.2a, gestrichelte Linien). In Abbildung 3.2b sind die Spektren für die eluierten Kofaktoren von in Pflanzen exprimiertem cry3-GFP in grün dargestellt. Als Kontrolle wurde Pflanzenmaterial der cry3 Mutante eingesetzt und parallel prozessiert. Die daraus resultierenden Spektren sind in grau dargestellt und zeigen kein Fluoreszenzsignal. Die von cry3-GFP eluierten Kofaktoren zeigten hingegen die gleichen Maxima wie kommerzielles MethenylTHF und die Kofaktoren des rekombinanten Cryptochroms.

Hier nicht gezeigt ist die ebenfalls durchgeführte Messung zur Untersuchung von MethylenTHF, der reduzierten Form von MethenylTHF. Die mit entsprechenden Exzitations- und Emissionswellenlängen aufgezeichneten Spektren ergaben weder für *E. coli* noch für pflanzen-exprimiertes cry3 verwertbare Signale, welche sich von der Baseline abgehoben hätten. Somit gab es keine Hinweise darauf, dass MethylenTHF an die isolierten Proteine gebunden ist.

Mit der gleichen Vorgehensweise, wie für die Folate, wurde auch die Anwesenheit von Flavinen in pflanzenexprimiertem cry3-GFP untersucht. Die Anregung für die Erstellung des Emissionsspektrums erfolgte hierbei mit 450 nm (Abbildung 3.2c und d). Neben den eluierten Kofaktoren von cry3-His-tag und cry3-GFP wurden als Standards die Flavine FAD, FMN und Riboflavin gemessen. Alle aufgezeichneten Spektren zeigten ein Emissionsmaximum bei etwa 520 nm. Im korrespondierenden Exzitationsspektrum für die Emission bei 520 nm zeigten sich in allen Proben zwei deutliche Maxima bei etwa 370 nm und 450 nm. Im Verhältnis der beiden Maxima zueinander zeigt sich ein Unterschied zwischen den Standards und den eluierten Kofaktoren. Für FAD, FMN und Riboflavin ist das Maximum bei 450 nm deutlich höher als das bei 370 nm, während für die eluierten Kofaktoren das Verhältnis umgekehrt ist.

Die aufgezeichneten Spektren zeigen deutlich, dass die unterschiedlichen Flavine unter diesen Bedingungen nicht anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften unterschieden werden können. Allerdings ist die Fluoreszenzintensität von FAD im Gegensatz zu Riboflavin stark pH abhängig

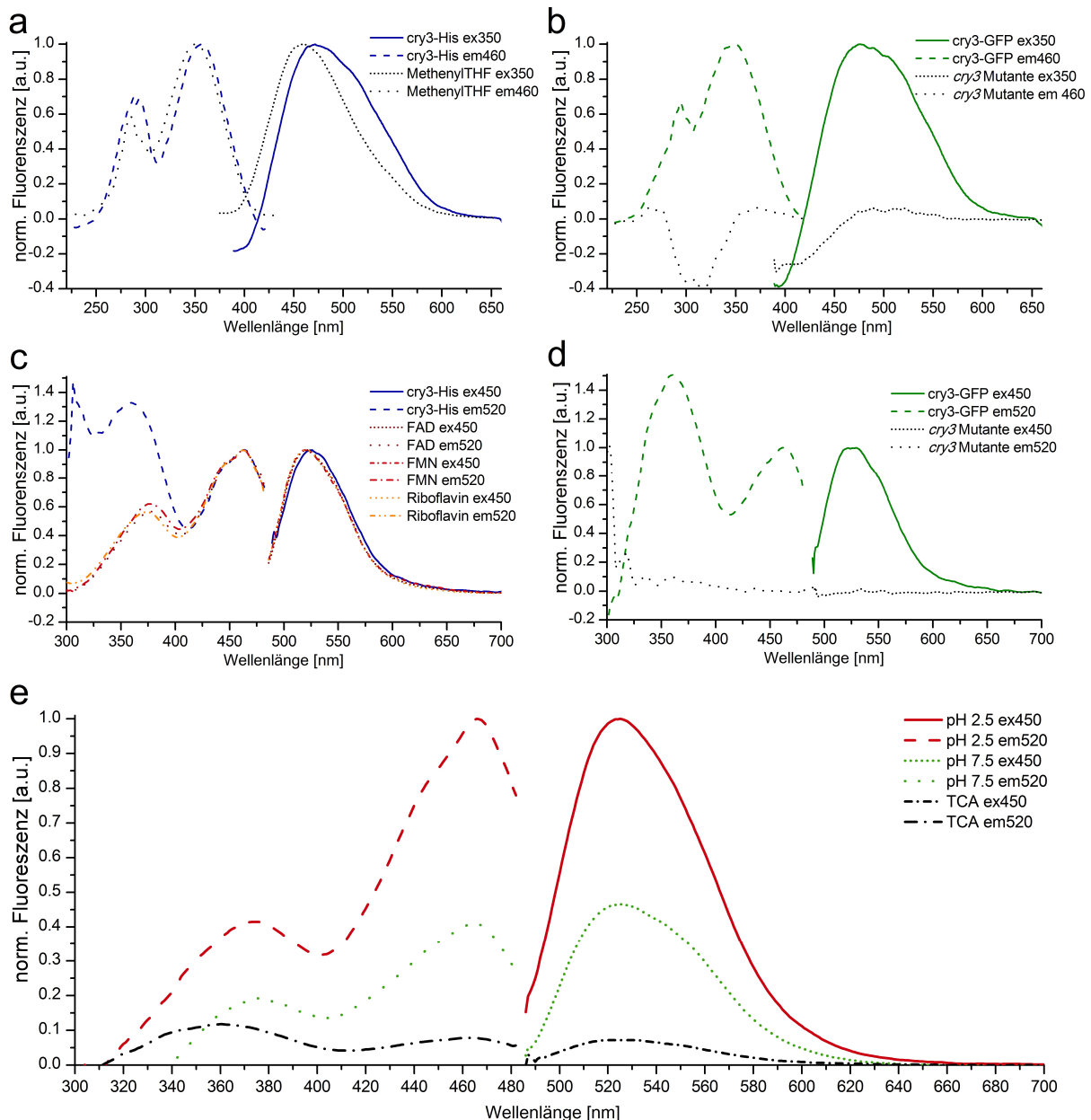


Abbildung 3.2 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der an cry3 gebundenen Kofaktoren.

Cry3-GFP wurde in *Arabidopsis* und cry3-His-tag in *E. coli* Zellen exprimiert. Mit Hilfe der Fusionen wurden die Proteine aufgereinigt und die Kofaktoren abgelöst. **a, b** Diese Eluate wurden wie der Standard MethenylTHF bei 350 nm angeregt und das Emissionsspektrum aufgezeichnet. Ebenso wurde das Exzitationspektrum für eine Emissionswellenlänge von 460 nm erfasst. **c bis e** Zur Untersuchung der Flavine wurde die Wellenlänge zur Anregung auf 450 nm und für die Emission auf 520 nm gesetzt. In **e** wurde der pH der Kofaktoren, die von cry3-GFP abgelöst worden waren, auf 2,5 und 7,5 eingestellt, während alle anderen Messungen in 7% TCA und 200 mM β -Mercaptoethanol durchgeführt wurden. Zur Messung der *Baseline* wurden die jeweiligen Puffer verwendet. Die erhaltene *Baseline* wurde von den eigentlichen Spektren subtrahiert. Zur besseren Darstellung wurde in den Emissionsspektren das Maximum bei 460 nm (**a,b**) bzw. 520 nm (**c,d**) und in den Exzitationspektren das Maximum bei 350 nm (**a,b**) bzw. 450 nm (**c,d,e**) auf 1 eingestellt. In **e** fand die Normierung gegen die entsprechenden Maxima der Probe mit einem pH von 2,5 statt.

(Islam *et al.*, 2003). Um Hinweise darauf zu erhalten, ob es sich bei dem an cry3-GFP gebundenen Flavin um FAD handelt, wurde das stark saure TCA-Eluat auf einen pH von 2,5 und 7,5 eingestellt. Die daraus resultierenden Spektren sind in Abbildung 3.2e dargestellt.

Das stärkste Fluoreszenzsignal wurde bei einem pH von 2,5 beobachtet, bei einem pH von 7,5 war das Signal weniger als halb so stark und in TCA betrug es sogar weniger als 10%. Diese beobachtete pH-abhängige Fluoreszenz, wie sie auch von Islam *et al.* beschrieben wurde, spricht für FAD. Außerdem fällt auf, dass sich das Verhältnis der beiden Peaks in den Exzitationsspektren in Abhängigkeit des pH-Werts zu verschieben scheint. In TCA war, wie oben beschrieben, für die eluierten Kofaktoren ein höherer Peak bei 350 nm zu beobachten. Wird der pH jedoch auf 2,5 bzw. 7,5 eingestellt ist das Maximum bei 450 nm deutlich höher und der Kurvenverlauf entspricht in etwa dem der verwendeten Standards.

3.1.3 Das HPLC-Elutionsprofil spricht für die Bindung von MTHF und FAD an pflanzenexprimiertes cry3

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Kofaktoren, die an pflanzenexprimiertes cry3-GFP gebunden sind, deuten darauf hin, dass es sich um MethenylTHF und FAD handelt. Weitere Hinweise auf die Identität der eluierten Kofaktoren kann die Auftrennung dieser auf einer HPLC-Säule liefern. Abbildung 3.3a zeigt die Auftrennung der Standardkofaktoren in äquimolaren Mengen, welche mit dem im Äkta *purifier* enthaltenen Spektrophotometer aufgezeichnet wurden. Die Absorption bei 360 nm zeigt dabei die Anwesenheit von MethenylTHF-Cl (MTHF-Cl), während die Flavine bei 450 nm detektiert werden können. Trägt man die gemessene Absorption gegen das Elutionsvolumen auf, wird deutlich, dass zuerst MTHF-Cl die Säule verlässt und mit deutlichem Abstand die Flavine folgen. Die Untersuchung der Elutionsprofile der einzelnen Standards erfolgte im Vorfeld unter anderem durch Julia Moldt in der AG Batschauer. Anhand ihrer Daten wurden hier die Standardkofaktoren den einzelnen Peaks zugeordnet. Sie hatte für die Flavine gezeigt, dass zunächst die Elution von FAD, in einem Abstand von 0,5 ml Volumen FMN und zuletzt die Elution von Riboflavin (RBFL) erfolgte. Weil die HPLC-Säule nutzungsbedingten Veränderungen unterliegt, ist eine zeitnahe Kalibrierung der Säule mit den Standardkofaktoren, wie sie hier durchgeführt wurde, unerlässlich. Denn die exakten Volumina, bei denen die Stoffe von der Säule eluieren, können sich durchaus verschieben.

Wie bereits erwähnt, reichte die Menge an pflanzenexprimiertem cry3 nicht aus, um die Absorption der gebundenen Kofaktoren zu detektieren. Um ein HPLC-Elutionsprofil zu erstellen, war es folglich nötig Fraktionen zu sammeln und die für MTHF bzw. Flavin typische Fluoreszenz zu detektieren. In Abbildung 3.3d und e wurde für MTHF das Maximum im Emissionsspektrum bei einer Anregung mit

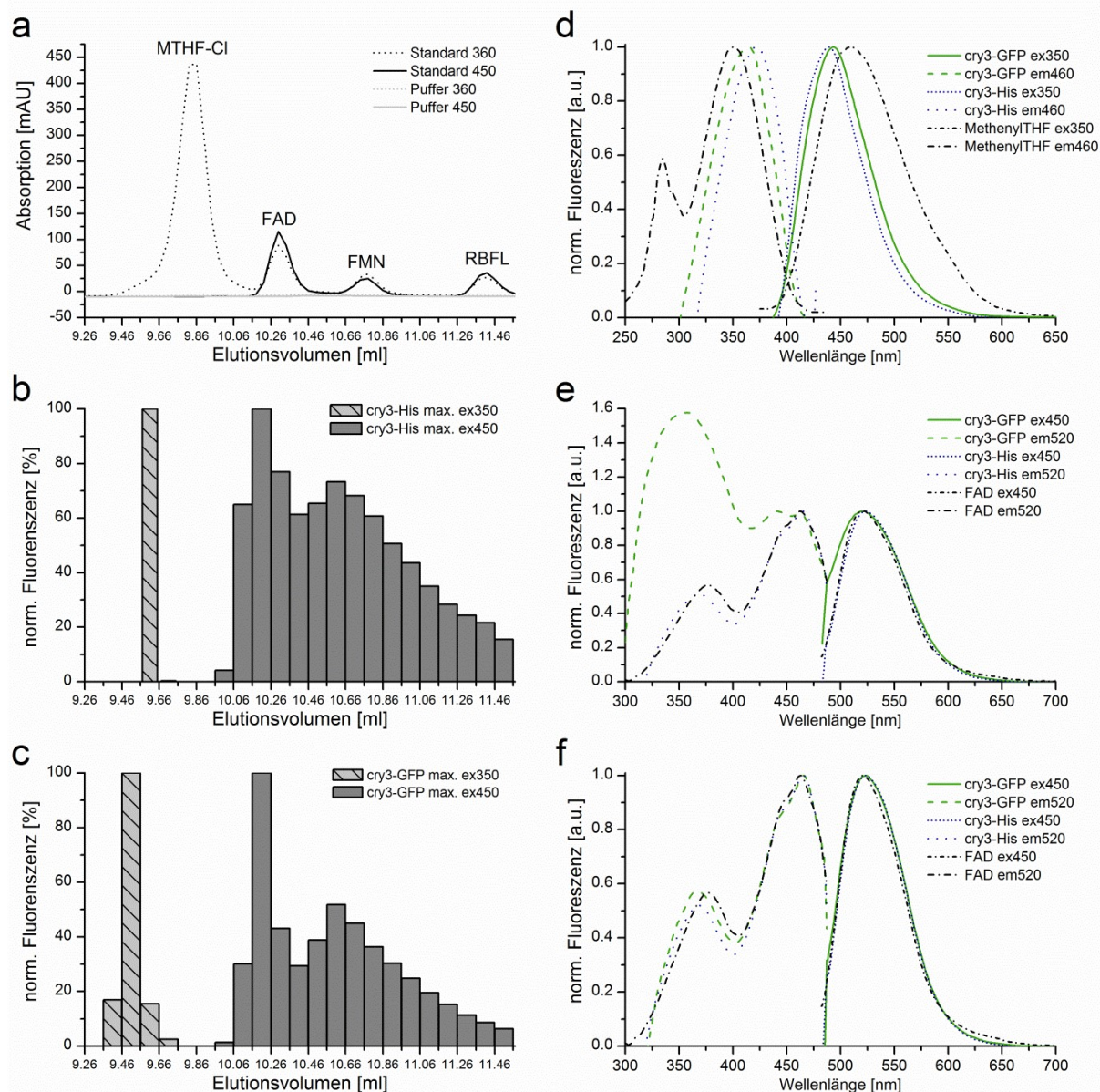


Abbildung 3.3 HPLC Auftrennung der cry3-gebundenen Kofaktoren.

Der pH-Wert der Proben wurde in Phosphat-Citratpuffer auf 2,5 eingestellt und Methanol in einer Endkonzentration von 10% zugegeben. Eine äquilibrierte Nucleosil 100-10 C18 Säule, die mit einem Äkta Purifier verbunden war, wurde für die *reversed-phase* HPLC verwendet. (a) Die Elution der Standardkofaktoren wurde mit dem eingebauten Spektrophotometer aufgezeichnet und die Peaks mit den entsprechenden Standardkofaktoren beschriftet. Die von *E. coli* exprimiertem cry3-His-tag (b) und pflanzenexprimiertem cry3-GFP (c) freigesetzten Kofaktoren wurden analog aufgetrennt. Fraktionen (0,1 ml) wurden gesammelt und die Exzitations- (Emission bei 460 nm bzw. 520 nm) sowie Emissionsspektren (Exzitation bei 350 nm bzw. 450 nm) aufgezeichnet. Das Maximum der Emissionsspektren wurde bestimmt und die höchste relative Fluoreszenz wurde auf 100% gesetzt (b,c). In d sind die Spektren gezeigt, die für das erste Maximum der Elutionsprofile in b und c aufgezeichnet wurden, sowie der Standardkofaktor MethenylTHF. In e und f sind entsprechend die Spektren für den zweiten und dritten Peak sowie FAD gezeigt. Die *Baseline* mit den entsprechenden Puffern wurde stets abgezogen. Zur besseren Darstellung wurde in den Emissionsspektren das Maximum bei 460 nm (d) bzw. 520 nm (e,f) und in den Exzitationspektren das Maximum bei 350 nm (d) bzw. 450 nm (e,f) auf eins gesetzt.

350 nm bestimmt. Die Fraktion mit der höchsten relativen Fluoreszenz in diesem Punkt wurde auf 100% gesetzt. Genauso wurde für die Flavine vorgegangen, wobei hier als Anregungswellenlänge 450 nm gewählt wurden. Als Kontrolle wurden ebenfalls die korrespondierenden Exzitationsspektren aufgezeichnet. In Abbildung 3.3d bis e sind die Kurvenverläufe für markante Punkte der Elutionsprofile gezeigt.

Als Kontrolle wurde auch hier aufgereinigtes *cry3-His-tag* verwendet, wobei ungefähr die gleiche Proteinmenge wie für *cry3-GFP* auf die HPLC-Säule geladen wurde (Abbildung 3.3b). Im Vergleich zu den gezeigten Standards fällt auf, dass das MTHF, welches an *cry3-His-tag* gebunden war, hier etwa zwei Fraktionen vor dem in (a) zu sehenden Maximum für MTHF-Cl eluiert. Zudem scheint nahezu alles MTHF in einer einzigen Fraktion vorzukommen. Eine Fraktion früher konnte hingegen die größte Menge des Folats für die aus Pflanzen gewonnene Probe beobachtet werden. Die Elution findet hier nicht ausschließlich in einer einzigen Fraktion statt, sondern erstreckt sich über 0,3 ml, wobei die Fraktionen vor und nach dem Maximum nur etwas weniger als 20% der maximalen Intensität zeigen (Abbildung 3.3c). In Abbildung 3.3d sind die aufgezeichneten Spektren für die Fraktionen mit den höchsten relativen Fluoreszenzen gezeigt. Vergleicht man die HPLC-Eluate mit dem Standard MethenylTHF zeigen sich geringe Unterschiede im Kurvenverlauf. Die Lage der jeweiligen Maxima der eluierten Kofaktoren von *cry3-GFP* (grün) und *cry3-His-tag* (blau) unterscheiden sich nur geringfügig. Im Vergleich zum Standard sind diese Maxima im Emissionsspektrum jedoch um etwa 25 nm zur kürzeren und im Exzitationsspektrum zur längeren Wellenlänge hin verschoben. Im Exzitationsspektrum fällt außerdem auf, dass das in 3.1.2 beschriebene zweite Maximum bei etwa 275 nm in den HPLC-Proben fehlt.

Im HPLC-Elutionsprofil für Flavin zeigt sich das absolute Maximum der an *cry3-His-tag* und *cry3-GFP* gebundenen Kofaktoren (b und c) etwa eine Fraktion vor dem Peak für Standard-FAD (a). Die *cry3* gebundenen Kofaktoren zeigen ein zweites, kleineres Maximum, das ca. 0,1 bis 0,2 ml vor dem Peak für FMN zu beobachten ist. Im Bereich von Riboflavin steigt die relative Fluoreszenz hingegen nicht noch einmal an. Das Verhalten der von *cry3-GFP* und *cry3-His-tag* eluierten Kofaktoren ähnelt sich sehr stark. Ein Unterschied ist, dass der erste Peak für *cry3-GFP* sehr deutlich ausgeprägt ist, die Fluoreszenz im zweiten Maximum ist nur etwa halb so stark, während sie für die *cry3-His-tag* gebundenen Kofaktoren noch über 70% beträgt.

Die Fluoreszenzspektren für das erste bzw. zweite Maximum sind in Abbildung 3.3 e bzw. f dargestellt. Im Emissionsspektrum ist kein nennenswerter Unterschied zwischen den eluierten Kofaktoren und dem Standard FAD zu erkennen, alle Proben zeigen hier ein Maximum bei 520 nm. Im korrespondierenden Anregungsspektrum zeigen sich erneut zwei Peaks und zwar bei etwa 370 nm und 450 nm. Unterschiede sind hier allerdings in Bezug auf das Verhältnis der beiden Peaks

zu einander zu erkennen. Für Standard-FAD und die an cry3-His-tag gebundenen Kofaktoren scheint stets der Peak bei 450 nm größer zu sein als der bei 370 nm. Bei den von cry3-GFP eluierten Kofaktoren zeigt sich eine so deutliche Übereinstimmung der Kurvenverläufe mit denen von FAD nur in den Messungen, die mit der Fraktion des zweiten Maximums erfolgten. Für die Fraktion des ersten Maximums ist der Peak bei 370 nm im Exzitationsspektrum für cry3-GFP deutlich höher als der bei 450 nm, so dass sich der Kurvenverlauf deutlich von dem für FAD und cry3-His-tag unterscheidet.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die an pflanzenexprimiertem cry3-GFP gebundenen Kofaktoren fast das gleiche Elutionsverhalten in einer HPLC zeigen wie die aus *E. coli*-exprimierten und aufgereinigten cry3-His-tag. Dieses Elutionsprofil deutet darauf hin, dass FAD das dominante Flavin in cry3 ist.

3.2 Expression und Lokalisation von cry3 in Pflanzenzellen

Die Fusion von speziellen, kleinen Peptiden, den sogenannten *tags*, an ein Zielprotein bietet zahlreiche Möglichkeiten dieses genauer zu charakterisieren. Für immunologische Nachweise und Anreicherungen zeichnen sich kurze *tags* wie die von c-Myc oder HA aus, da effektive Antikörper gegen diese kommerziell verfügbar sind. Die geringe Größe dieser Fusionen soll außerdem die Wahrscheinlichkeit minimieren, dass der *tag* Einfluss auf die Funktion des Zielproteins nimmt. Soll das Protein hingegen in lebenden Zellen mikroskopisch beobachtet werden, bietet sich die Verwendung von kleinen fluoreszierenden Proteinen, wie GFP und seinen Varianten an.

3.2.1 Expression von cry3-HA in transgenen *Arabidopsis*-Linien

Die komplette proteinkodierende Sequenz von cry3 wurde mit HA oder c-Myc-tags fusioniert, um diese Fusionsproteine unter Kontrolle des 35S-Promotors in Pflanzenzellen zu exprimieren. Die Transformation und Insertion in das pflanzliche Genom erfolgte mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*. Zunächst wurde die Expression der Fusionsproteine transient in Tabakblättern getestet, welche mit der entsprechenden Agrobakterien-Suspension infiltriert worden war (siehe 2.2.7.4). Gesamtextrakte der transformierten Blätter wurden mittels *Western blot* untersucht. Es gelang jedoch nur der immunologische Nachweis von cry3-HA. Für die c-Myc Fusion zeigte sich weder ein Signal erwarteter Größe, noch war eine Bande zu erkennen, die nur in den transformierten Blättern auftrat (Daten nicht gezeigt). Dies führte dazu, dass dieses Konstrukt im Folgenden nicht weiter verwendet wurde.

Zur Herstellung von *Arabidopsis*-Linien, die stabil cry3-HA exprimieren, wurden die weiblichen Gametophyten, die sich noch in den geschlossenen Blüten befanden, mittels *Floral Dip*

transformiert (siehe 2.2.7.5). Als Ausgangsmaterial wurde die *cry3* Mutante mit dem dazugehörigen Wildtyp Nossen verwendet, sowie die Ökotypen *Ler* und *Col*. Neben dem Gen für das *cry3*-Fusionsprotein wurde mit dem verwendeten Plasmid (pFGC5941) auch eine BASTA-Resistenz übertragen, welche als Selektionsmarker dient. Resistente Pflanzen wurden geselbstet und die Folgegeneration erneut auf die BASTA Resistenz selektioniert. Da in der Folgegeneration nahezu alle Pflanzen eine BASTA-Resistenz zeigten, muss davon ausgegangen werden, dass die Konstrukte mehr als einmal und an unterschiedlichen Loci ins Genom inseriert wurden. Dieser Umstand erschwert das Etablieren einer homozygoten Linie, weshalb zunächst mit potentiell heterozygoten Linien gearbeitet wurde. Um zu verhindern, dass fälschlicherweise Pflanzenmaterial verwendet wird, welches das Zielprotein nicht exprimiert, wurden die Pflanzen stets durch eine BASTA-Behandlung selektiert.

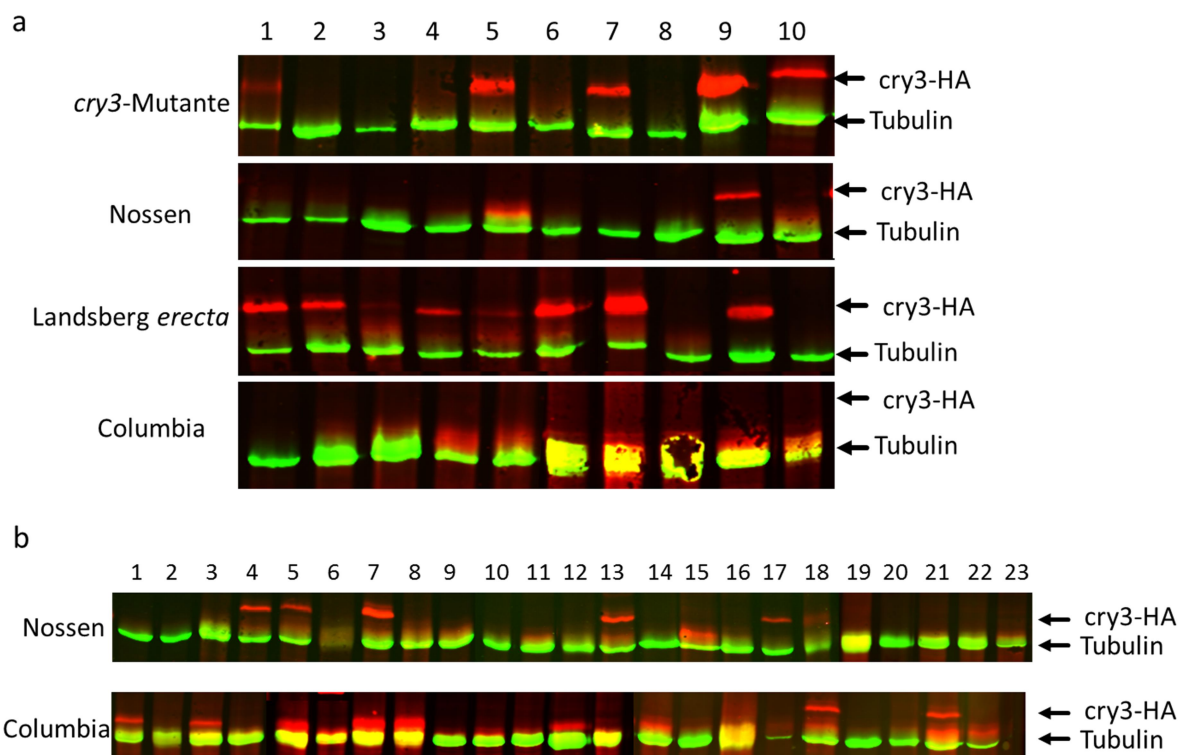


Abbildung 3.4 Western blot zeigt Expression von *cry3*-HA in *Arabidopsis*.

Die drei *Arabidopsis thaliana* Wildtypen Nossen, Landsberg *erecta* und Columbia sowie die *cry3* Mutante wurden mittels *Floral Dip* mit CRY3-HA transformiert. (a) Die Expression von *cry3*-HA wurde in jeweils 10 BASTA-resistenten Pflanzen mittels *Western blot* untersucht (1 bis 10). Dafür wurden Proteingestamtextrakte aus 1 bis 2 Blättern der transformierten Pflanzen mittels TCA/Aceton-Fällung hergestellt und etwa 15 µg Protein aufgetrennt. (b) Nossen und Columbia wurden ebenfalls wie beschrieben transformiert und jeweils 23 Pflanzen untersucht. Als primäre Antikörper wurden anti- α -Tubulin (Sigma Aldrich GmbH) sowie anti-HA *high affinity* (Roche) und als sekundäre Antikörper IRDye®680 Goat anti-rat (in rot dargestellt) sowie IRDye® 800CW donkey anti-mouse IgG (in grün dargestellt) verwendet. Die Visualisierung erfolgte mit dem Odyssey® Imaging System (LI-COR Biosciences). Die erwarteten Laufhöhen für *cry3*-HA und α -Tubulin sind mit einem Pfeil markiert.

Die Basta-Resistenz ist eine gute Möglichkeit, die Insertion des Konstrukts zu überprüfen bzw. darauf zu selektieren. Allerdings stellt dies noch keine Garantie für eine gute Expression des Zielproteins dar. Um dies zu überprüfen, wurden Proteingestamtextrate mittels *Western blot* untersucht. Zum Nachweis von cry3-HA wurden Antikörper gegen den tag und als Lade- sowie Transferkontrolle solche gegen α -Tubulin eingesetzt. Das Resultat für jeweils 10 getestete Pflanzen der ersten Transformation ist in Abbildung 3.4a dargestellt. Die Insertion in die cry3 Mutante und in Ler hat 5 bzw. 7 Pflanzen hervorgebracht, die ein deutliches und spezifisches Signal für den HA-Antikörper zeigen, das der erwarteten Größe für cry3-HA entspricht (cry3 Mutante Nr. 1, 5, 7, 9, 10; Ler 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9). Die Transformation von Nossen und Columbia erwies sich als weniger effizient. Im Ökotyp Columbia zeigte keine der zehn Pflanzen das zu erwartende Signal und im Fall von Nossen nur eine. Besonders im Fall von Columbia war zwar in zahlreichen Proben eine für HA spezifische Bande zu erkennen, allerdings entsprach die Größe nicht den erwarteten 68,5 kDa, sondern befand sich nur etwas oberhalb der α -Tubulin-Bande (ca. 50 kDa) (Daten nicht gezeigt).

Da die Ursache für dieses Phänomen nicht geklärt werden konnte, wurden diese Ökotypen erneut transformiert und selektioniert. Daraufhin wurden 23 Pflanzen im *Western blot* getestet (Abbildung 3.4b). Für Nossen konnten schließlich 5 weitere Pflanzen identifiziert werden, die offensichtlich cry3-HA exprimieren (Nr. 4, 5, 7, 13 und 17). Für Columbia war hingegen nur in zwei Pflanzen (Nr. 18 und 21) eine Bande der erwarteten Größe zu finden. Doch auch diese beiden Pflanzen zeigten die schon zuvor beobachtete kleinere Bande, die zusätzlich noch in 8 weiteren Proben nachweisbar war (Nr. 1, 3, 5, 7, 8, 12, 14 und 22). Insgesamt war es trotzdem gelungen, in den drei Wildtypen und der cry3 Mutante mehrere Pflanzen zu generieren, die im *Western blot* gut detektierbare Mengen von cry3-HA exprimieren.

3.2.2 Die cry3-HA Proteinmenge ist während der Deetiolierung von Keimlingen weitestgehend stabil

Während der Deetiolierung von Keimlingen ist die cry3-Transkriptmenge starken Schwankungen unterlegen. Da cry3-HA in den transgenen Linien unter Kontrolle des 35S-Promotors steht, besteht die Möglichkeit zu überprüfen, ob die Proteinmenge auch posttranskriptionell reguliert wird.

Daher wurden drei Tage alte etiolierte Keimlinge über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Weißlicht bestrahlt und die relative cry3-HA Proteinmenge in löslichen Gesamtextrakten nach 0, 4, 12 und 24 Stunden bestimmt (siehe 2.4.1.7). Untersucht wurden dabei die cry3-HA-Linien #9 und 10 (siehe Abbildung 3.4). Die zur Quantifizierung verwendeten *Western blots* sind in Abbildung 3.5a gezeigt. Um Ungenauigkeiten bei der Proteinmengenbestimmung, dem Beladen des Gels oder dem Transfer auszugleichen, wurde neben dem HA-tag auch α -Tubulin detektiert und zur Normierung der Proben

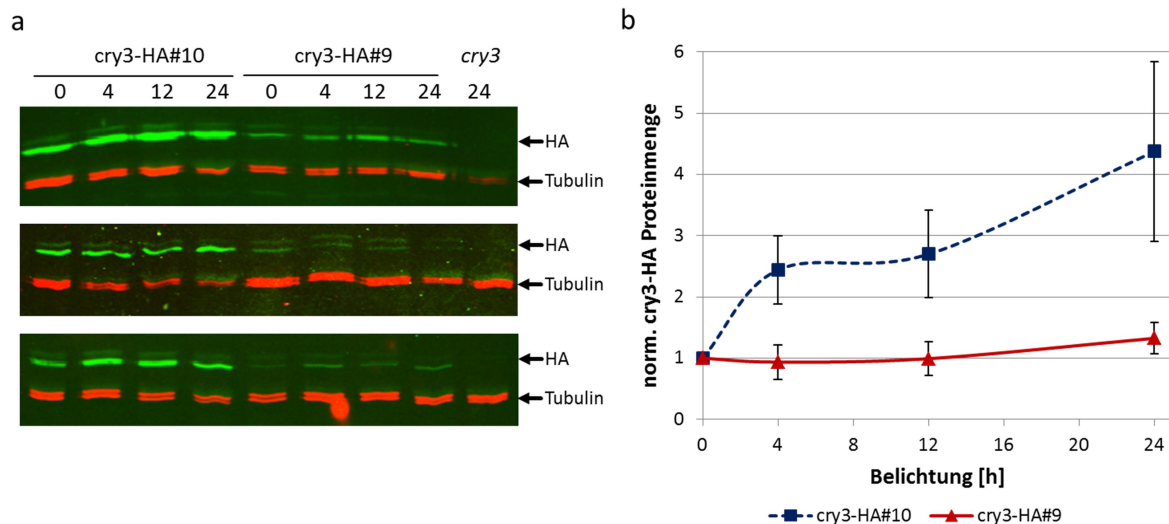


Abbildung 3.5 Proteinmenge von cry3-HA während der Deetiolierung von Keimlingen.

Drei Tage alte etiolierte Keimlinge wurden über 24 Stunden mit Weißlicht bestrahlt, nach 0, 4, 12 und 24 Stunden wurden Proben genommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um im Anschluss daraus lösliche Proteingestamtextakte herzustellen. Untersucht wurden zwei transgene *Arabidopsis*-Linien, die im Hintergrund der *cry3* Mutante cry3-HA unter Kontrolle des 35S Promotors exprimieren (#9 und #10, siehe auch Abbildung 3.4). Die relative Menge an cry3-HA in ca. 10 µg der Extrakte wurde mittels *Western blot* aus drei unabhängigen Proben bestimmt. (a) Als primäre Antikörper wurden anti- α -Tubulin (Sigma Aldrich) sowie anti-HA *high affinity* (Roche) und als sekundäre Antikörper IRDye®680 goat *anti-rat* (in rot dargestellt) sowie IRDye® 800CW *donkey anti-mouse* IgG (in grün dargestellt) verwendet. Die Visualisierung und Quantifizierung erfolgte mit dem Odyssey® Imaging System (LI-COR Biosciences). (b) Die Normierung der Proben erfolgte zunächst gegen das α -Tubulin-Signal und anschließend gegen die jeweilige 0-Stunden-Probe. Gezeigt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern.

als interner Standard verwendet. Darüber hinaus erfolgte eine zweite Normierung gegen die jeweilige 0-Stunden-Probe. Insgesamt wurde das Experiment mit jeder Linie dreimal durchgeführt, die in Abbildung 3.5b gezeigten Datenpunkte basieren somit auf je drei unabhängigen Proben. Die cry3-HA-Linie #9 zeigt über den gesamten Messzeitraum eine sehr konstante Proteinmenge, die sich nicht von der Dunkelprobe unterscheidet. Für die Linie #10 verdoppelt sich nach 4 Stunden Belichtung hingegen die Menge an cry3-HA. Nach 24 Stunden steigt dieser Wert im Vergleich zur 0-Stunden-Probe sogar auf das über vierfache an. Der durchgeführte t-Test konnte aufgrund der großen Schwankungen innerhalb der drei Durchgänge allerdings keine Signifikanz bestätigen.

3.2.3 Affinitätsmarkiertes cry3 findet sich als lösliches Protein in den Chloroplasten

Die bekannte Lokalisation von cry3 in den Chloroplasten sollte hier für die HA- und GFP-markierten Varianten überprüft und darüber hinaus eine mögliche Anreicherung in oder an den Thylakoiden untersucht werden.

Als Ausgangsmaterial wurden dazu Rosettenblätter von adulten, im Kurztag gewachsenen *Arabidopsis* Pflanzen der cry3-HA Linie #10 im Hintergrund der *cry3* Mutante und eine homozygote

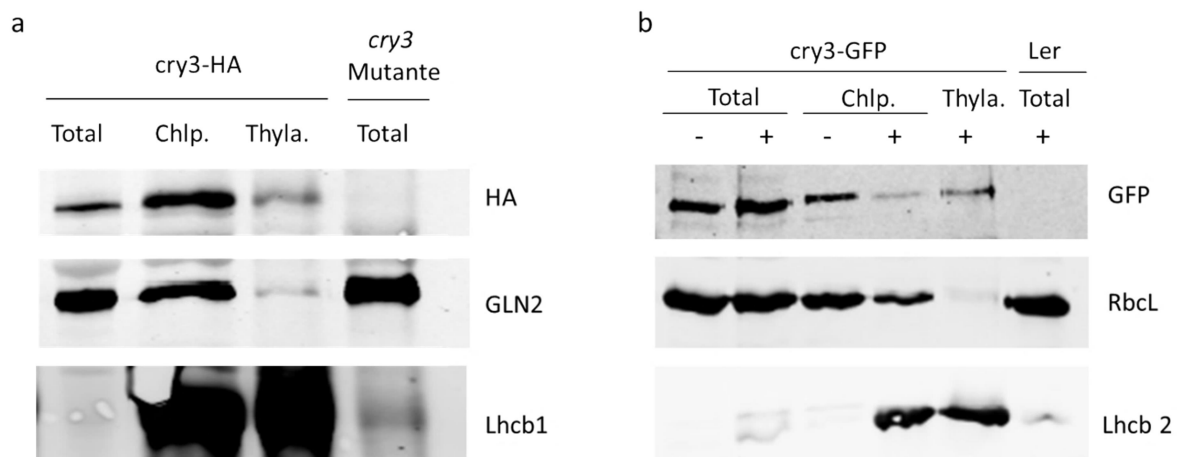


Abbildung 3.6 Cry3-HA und cry3-GFP sind in Chloroplasten mittels *Western blot* nachweisbar.

Proteinextrakte wurden aus adulten Rosettenblättern von *Arabidopsis* hergestellt. Es wurden Pflanzen verwendet, die cry3-HA in der cry3 Mutante (a) oder cry3-GFP in Ler (b) exprimieren sowie die jeweiligen Hintergrundlinien. Neben dem Gesamtprotein (Total) wurden jeweils 10 µg Proteinextrakte aus Chloroplasten (Chlp.) und Thylakoiden (Thyla.) mittels *Western blot* untersucht. In a enthielten alle Proben Detergenz während in b die Extrakte mit (+) oder ohne (-) Detergenz (0,5% NP-40, 0,1% Triton X-100) hergestellt wurden. Zur Detektion der cry3-Fusionsproteine wurden die Antikörper anti-HA *high affinity* (Roche) und *goat anti-GFP* (Rockland) verwendet. Zur Qualitätskontrolle der Extrakte wurden Antikörper gegen GLN2, RbcL, Lhcb1 und Lhcb2 von Agrisera verwendet. Die Visualisierung erfolgte mit entsprechenden fluorophormarkierten sekundären Antikörpern von LI-COR Biosciences und dem Odyssey® Imaging system (LI-COR Biosciences).

cry3-GFP Linie (siehe 2.1.5.1) in Ler verwendet. Aus dem Blattmaterial wurden entweder direkt native Proteingesamtextrikte (2.4.1.6) hergestellt oder zunächst Chloroplasten und Thylakoide isoliert (siehe 2.4.1.8, 2.4.1.8 und 2.4.1.10). Zur Extraktion der Proteine wurde im Fall von cry3-HA immer Detergenz (0,5% NP-40, 0,1% Triton X-100) verwendet, während für cry3-GFP auch lösliche Extrakte ohne Detergenz hergestellt wurden. Um die Spezifität der Signale für cry3-HA bzw. cry3-GFP im *Western blot* zu überprüfen, wurden ebenfalls Gesamtextrikte aus den Parentallinien geprüft, die zur Erzeugung der transgenen Linien verwendet wurden.

In Abbildung 3.6a ist für cry3-HA eine deutliche Anreicherung in der Chloroplastenfraktion zu finden, während in der Thylakoid-Probe nur ein vergleichsweise schwaches Signal zu erkennen ist. Dieses Verhalten entspricht in etwa dem des löslichen Chloroplastenproteins Glutaminsynthetase 2 (GLN2). *LHCII type I chlorophyll a/b-binding protein* (Lhcb1), ein Protein des Lichtsammelkomplexes des PSII, ist hingegen in der Thylakoidfraktion sehr stark angereichert und im Vergleich dazu in den Gesamtextrikten relativ schwach vertreten. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch für die GFP-fusionierte Variante von cry3 (Abbildung 3.6b), wobei deutlich größere Mengen cry3-GFP in der Chloroplastenfraktion ohne Detergenz als in der mit zu detektieren sind. Zur Kontrolle der Extrakte wurden hier das lösliche Chloroplastenprotein Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RbcL) und das Membranprotein Lhcb2 verwendet. Während Lhcb2 nur in Extrakten mit Detergenz detektierbar war und dabei besonders stark in der Chloroplasten- sowie Thylakoidfraktion, ist die

Menge an RbcL und cry3-GFP besonders in der Letzteren vergleichsweise gering. Am stärksten erscheinen für cry3-GFP und RbcL jedoch die Banden in den Gesamtextrakten.

Zusammengefasst war sowohl die HA- als auch die GFP-fusionierte Variante von cry3 in Chloroplastenextrakten deutlich zu detektieren oder sogar angereichert. In den Thylakoidfraktionen waren die cry3-Fusionsproteine hingegen nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Die Untersuchung von cry3-GFP mit und ohne Detergenz zeigte zudem, dass das Protein in dem verwendeten Puffer ohne den Zusatz von Detergenz löslich ist.

3.2.4 Die *size exclusion chromatography* deutet auf das Vorkommen von cry3 in einem hochmolekularen Komplex hin

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die fusionierten Varianten von cry3, im Gegensatz zu den anderen beiden Cryptochromen von *Arabidopsis thaliana*, in den Chloroplasten zu finden sind. Für eine mögliche Funktion von cry3 könnte dabei interessant sein, ob cry3 als Monomer in den Organellen vorliegt oder dort mit einem größeren Proteinkomplex assoziiert ist.

Eine Möglichkeit dies zu untersuchen ist die *size exclusion chromatography* (SEC). Bei dieser Art der Flüssigchromatographie können die Proteine bzw. Proteinkomplexe der Größe, oder genauer ihres hydrodynamischen Volumens entsprechend, aufgetrennt werden. Möglich wird dies durch das hydrophile, poröse und quervernetzte Material der Säulen. Kleine Moleküle dringen leichter in die Poren ein und werden somit länger auf der Säule zurück gehalten, eluieren folglich später als große Moleküle. Hier wurde eine Superdex 200 von GE Healthcare verwendet, die mit einer Mischung von Standardproteinen kalibriert wurde (*Gel filtration molecular weight markers* von Sigma Aldrich: *Cytochrome C*, *Carbonic Anhydrase*, *Bovine serum Albumin*, *Alcohol dehydrogenase*, *Beta Amylase*, *Blue Dextran*). Die Säule zeigt nur für einen Bereich von ca. 10 bis 200 kDa ein lineares Elutionsverhalten. Untersucht wurden allerdings auch Massenbereiche darüber hinaus, da viele Proteinkomplexe in Chloroplasten wesentlich größer sind. Der Bereich, welcher dem Peak von Blue Dextran entspricht, wird hier als Fraktion mit hohem Molekulargewicht bezeichnet und gibt gleichzeitig das Ausschlussvolumen der Säule an. Moleküle die größer sind, können nicht in die Matrix eintreten.

Aufgetrennt wurden Chloroplastenextrakte aus Rosettenblättern von adulten im Kurztag gewachsenen Pflanzen der cry3-HA-Linie #10, die sich im cry3 Mutanten Hintergrund befindet. Zur Solubilisierung der Proteine wurde dabei zunächst ein Tris-Puffer mit 0,5% NP-40 und 0,1% Triton X-100 verwendet. Der erhaltene Proteinextrakt wurde über die Superdex 200 Säule aufgetrennt und das Eluat in Fraktionen von je 0,5 ml gesammelt. Die Anwesenheit von cry3-HA, RbcL und Lhcb1 wurde mittels *Western blot* mit entsprechenden Antikörpern gegen den tag bzw. die Proteine RbcL

und Lhcb1 untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Quantifizierung der gezeigten Proteinbanden erfolgte relativ zum Input (hier nicht gezeigt), der neben einem Proteingrößenmarker ebenfalls auf jedem *Western blot* enthalten war. Die relativen Proteinmengen sind als Balkendiagramm dargestellt. Die Auftragung erfolgte gegen die maximale Proteingröße einer Fraktion (diese wurde durch die Kalibrierung ermittelt), oder wenn sich diese außerhalb des linearen Bereichs befand, gegen die Anzahl an gesammelten Fraktionen.

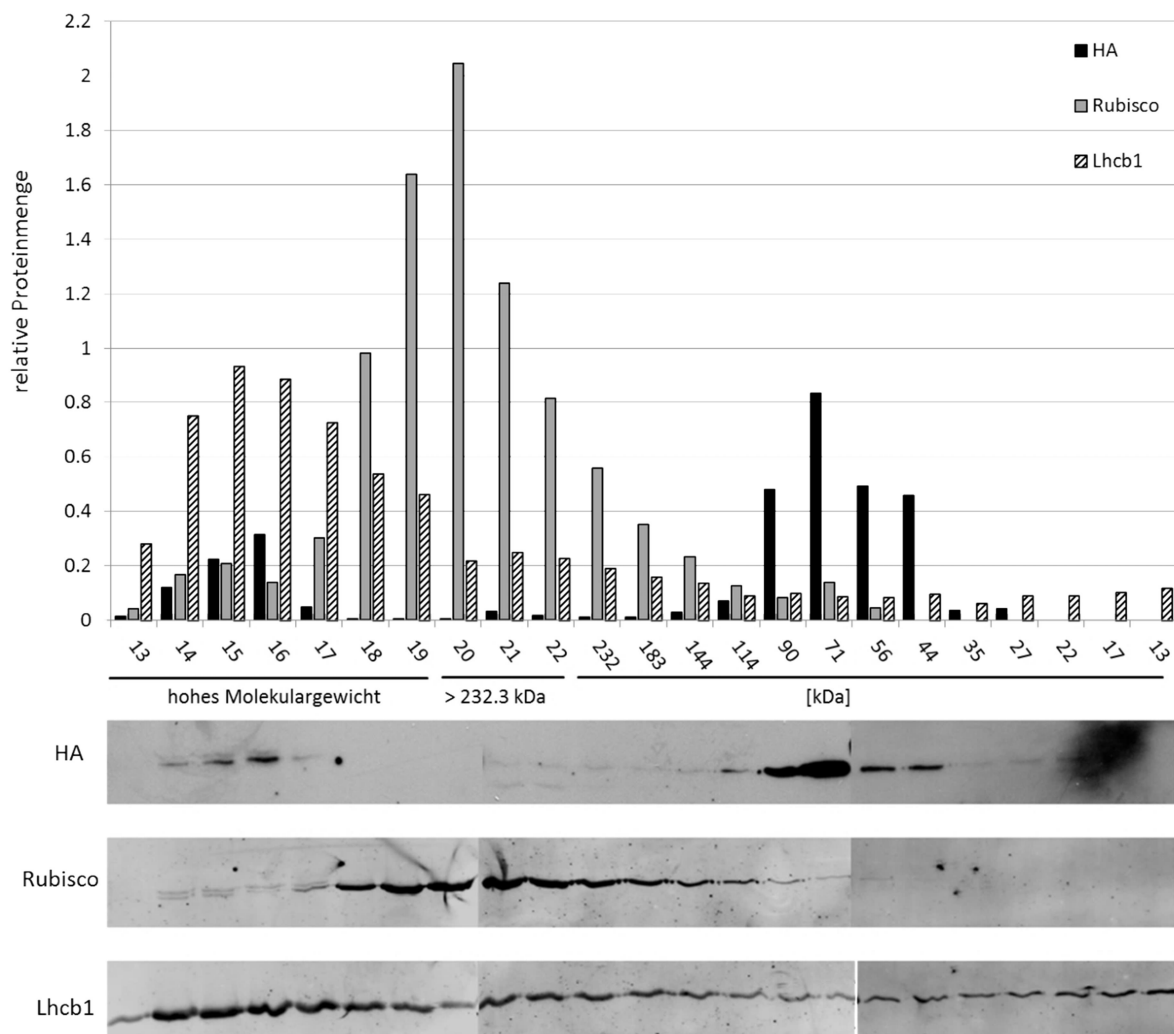


Abbildung 3.7 SEC mit Detergenz zeigt zwei Peaks für cry3-HA.

Aus Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana*, die cry3-HA überexprimieren, wurden Chloroplasten angereichert und die Proteine daraus mit 0,5% NP-40 und 0,1% Triton X-100 extrahiert. Die gefilterten Proteinextrakte wurden auf eine kalibrierte Superdex 200 Säule (GE Healthcare) geladen, die an einen Äkta purifier angeschlossen war. Fraktionen von je 0,5 ml wurden aufgefangen und mittels *Western blot* untersucht. Die Immunodetektion der HA-Epitope erfolgte mit anti-HA *high affinity* (Roche) und *Goat anti rat HRP conjugated* (Sigma-Aldrich). Als Substrat wurde das Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio Rad) verwendet und die Expositionsdauer der Filme betrug 15 min. Die Quantifizierung der Banden erfolgte relativ zum Input mit Image J. RbcL und Lhcb1 wurden mit Antikörpern von Agrisera detektiert und der sekundäre Antikörper IRDye® 800CW donkey anti-rabbit IgG (LI-COR Biosciences) wurde mit dem Odyssey® Imaging System (LI-COR Biosciences) visualisiert und quantifiziert. Die relative Proteinmenge ist gegen das maximale Molekulargewicht einer Fraktion aufgetragen. Für die Bereiche, in denen Proteine/Proteinkomplexe erwartet werden die größer als 232 kDa sind, wurden die Nummern der gesammelten Fraktionen angegeben (13 bis 22).

Die größte Menge an cry3-HA war in der Fraktion von 56 kDa bis 71 kDa zu detektieren, in diesen Bereich wäre auch das Monomer zu vermuten. Ein zweites, wenn auch kleineres Maximum, zeigt sich in dem Bereich mit einem hohen Molekulargewicht, besonders in Fraktion 16. In etwa dem gleichen Bereich ist auch ein deutlicher *Peak* für Lhcb1 zu erkennen, wobei geringe Mengen des Proteins in jeder untersuchten Fraktion detektiert wurden. RbcL hingegen ist fast ausschließlich in einem einzigen, relativ breiten Peak zu erkennen, der sich von etwa 183 kDa bis in das hohe Molekulargewicht erstreckt. Die größte Menge an RbcL wurde dabei in Fraktion 20 verzeichnet. Dies deutet auf einen großen Komplex mit mehreren hundert kDa hin, wobei das Elutionsmaximum deutlich nach denen für Lhcb1 und cry3-HA zu finden ist.

Die Anwesenheit von Detergenz in den Extrakten kann allerdings dazu führen, dass das detektierte hydrodynamische Volumen stark von dem tatsächlichen Molekulargewicht abweicht. Für die Retention auf der Säule ist nicht das eigentliche Molekulargewicht entscheidend, sondern das Volumen, welches auch durch die Hülle aus Detergenz bestimmt wird, die sich um das hydrophobe Protein bildet. Um zu überprüfen ob das Vorkommen von cry3-HA in einem Bereich, in dem große Proteinkomplexe wie die LHCs zu finden sind, in einem Zusammenhang mit dem verwendeten Detergenz steht, wurde auch das Verhalten löslicher Chloroplastenextrakte ohne Detergenz in der SEC untersucht. Es zeigt sich, dass cry3-HA auch ohne Detergenz nicht nur in Fraktionen detektiert wurde, die dem Monomer zugeschrieben werden können (siehe Abbildung 3.8a). Zwar ist das absolute Maximum in der Fraktion von 52 kDa bis 66 kDa lokalisiert, daneben zeigt sich aber erneut ein weiterer deutlicher *Peak* mit hohem Molekulargewicht und einem Maximum in Fraktion 16. Interessanterweise ist auch im Bereich um 212 kDa das Vorhandensein von cry3 zu beobachten. Außerdem sind im *Western blot* mit Proben um 212 kDa mit dem Antikörper gegen HA zwei Banden detektiert worden. Eine auf der erwarteten Laufhöhe für cry3-HA und eine zweite etwas darüber.

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurden nicht nur Chloroplastenextrakte der cry3-HA exprimierenden Linie, sondern auch der cry3 Mutante über die SEC aufgetrennt. In Abbildung 3.8b ist ein *Western blot* gezeigt auf dem Fraktion 15 (H15), sowie die Eluate von 168 kDa bis 212 kDa (212) und 52 kDa bis 66 kDa (66) beider *Arabidopsis*-Linien aufgetrennt wurden. Während das Signal im Bereich mit hohem Molekulargewicht sowie in der Fraktion bis 66 kDa spezifisch zu sein scheint, taucht die größere Proteinbande in Fraktion 212 auch in der cry3 Mutante auf und zeigt somit nicht die Anwesenheit von cry3-HA an. Überraschend ist, dass weder die Bande erwarteter Größe noch die größere Bande auf diesem Blot in der cry3-HA Linie sichtbar ist, obwohl eine Detektion vorher möglich war, siehe Abbildung 3.8a. Ob diese Variabilität durch die Lagerung der Probe bedingt wurde oder die *Western blots* eine schwankende Sensitivität zeigten müsste näher untersucht werden, beides ist durchaus vorstellbar, besonders da sehr nah an der

Detektionsgrenze gearbeitet wurde.

Ein möglicher Einfluss des HA-tags auf das Verhalten von cry3 in der SEC wurde überprüft, indem auch Extrakte der Linie untersucht wurden die cry3-GFP unter Kontrolle des 35S Promotors exprimiert. Als problematisch erwies sich dabei der Umstand, dass die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen GFP eine geringere Sensitivität und Spezifität zeigten, als die Antikörper gegen HA.

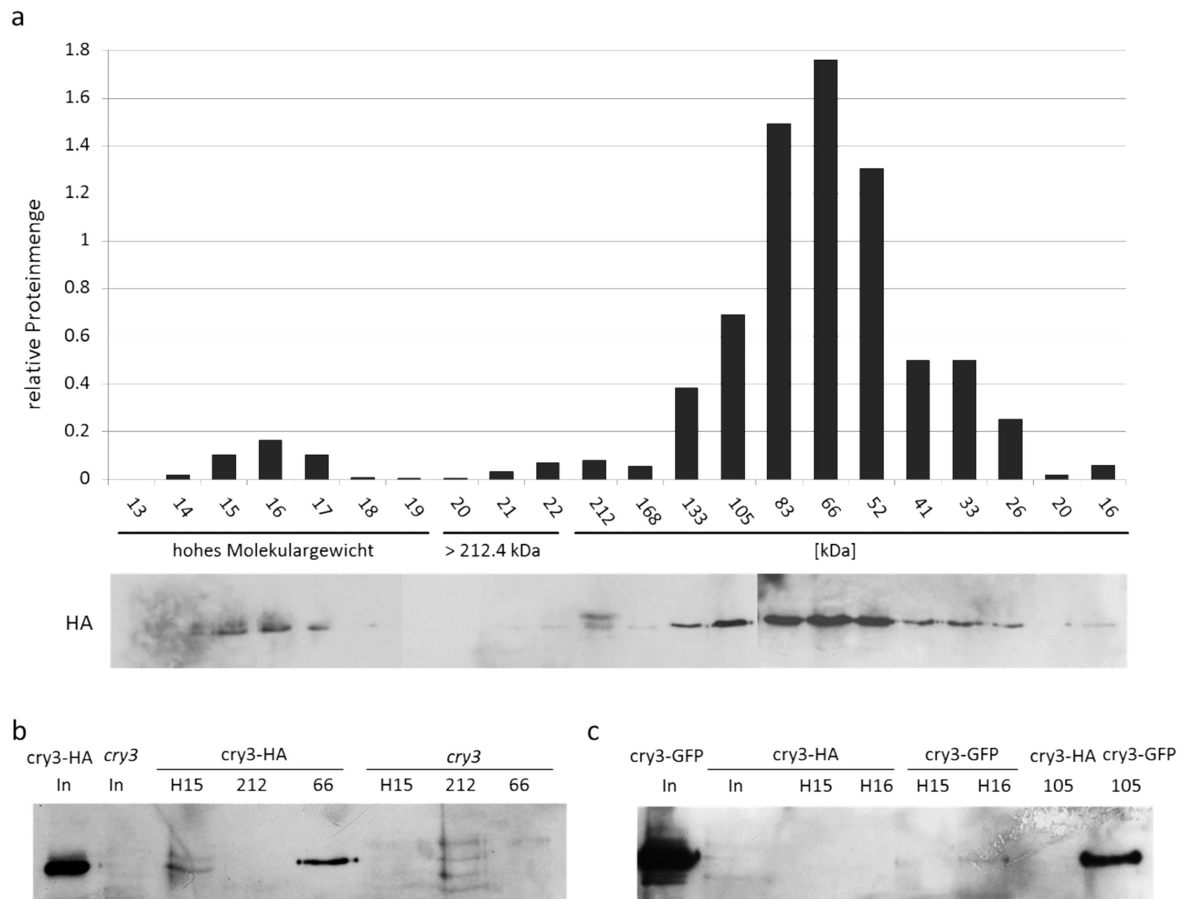


Abbildung 3.8 SEC ohne Detergenz zeigt ein spezifisches Signal für cry3-HA im Bereich mit hohem Molekulargewicht.

Aus Rosettenblättern adulter Pflanzen der *cry3* Mutante sowie den Linien die cry3-HA und cry3-GFP überexprimieren, wurden Chloroplasten isoliert und die löslichen Proteine extrahiert. Die gefilterten Proteinextrakte wurden auf eine kalibrierte Superdex 200 von GE Healthcare geladen, die an einen Äkta purifier angeschlossen war. Fraktionen von je 0,5 ml wurden gesammelt und mittels *Western blot* untersucht. Das HA-Epitop wurde mit anti-HA high affinity (Roche) und *Goat anti rat HRP conjugated*, GFP mit *goat anti-GFP* (Rockland) und *Rabbit anti-goat IgG HRP conjugated* (Agrisera) detektiert. Als Substrat wurde das Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio Rad) verwendet und die Expositionsdauer der Filme betrug 15 bis 30 min. Die Quantifizierung der Banden erfolgte relativ zum Input mit Image J. **(a)** Für cry3-HA sind die relative Proteinmenge gegen das maximale Molekulargewicht einer Fraktion aufgetragen, für den Bereich in dem Proteine/Proteinkomplexe mit einer Masse über 212 kDa erwartet werden, sind die Nummern der Fraktionen angegeben (13 bis 22). **(b)** Der Input (In), die Fraktion 15 (H15), sowie die Fraktionen bis 212 kDa und 66 kDa aus einer SEC mit der *cry3* Mutante und cry3-HA wurden auf einem *Western blot* untersucht. Detektiert wurde das HA-Epitop. **(c)** Der Input (In), die Fraktionen 15 (H15) und 16 (H16), sowie die Fraktion bis 105 kDa aus SECs der cry3-HA und cry3-GFP exprimierenden Linien wurde untersucht und der GFP-tag detektiert.

In Abbildung 3.8c wurden die Fraktionen der cry3-GFP- und cry3-HA-Proben untersucht, in welchen das Cryptochrom vermutet wurde. Ein sehr deutliches und spezifisches Signal taucht für cry3-GFP in der Fraktion von 83 kDa bis 105 kDa auf, was der erwarteten Größe für ein Monomer dieses Fusionsproteins entspricht. In den Fraktionen mit hohem Molekulargewicht H15 und H16 ist nur ein schwaches Signal auf erwarteter Laufhöhe zu detektieren, diese Bande ist jedoch spezifisch für die cry3-GFP-Linie und taucht nicht in der cry3-HA Probe auf (wenn der GFP-tag im *western blot* detektiert wird).

Zusammengefasst hat die SEC gezeigt, dass cry3 mit HA- oder GFP-tag hauptsächlich in einem Bereich eluieren, welcher dem Monomer entspricht. Im *Western blot* sind aber auch spezifische Signale für beide Fusionen in einem Bereich zu detektieren, der auf ein wesentlich höheres Molekulargewicht hindeutet. Somit könnte ein Teil von cry3 höher molekulare Komplexe bilden, entweder durch Interaktion mit anderen Proteinen, oder durch Selbstaggregation.

3.2.5 YFP markiertes cry3 ist im Zellkern und in Chloroplasten von Pflanzenzellen zu finden

Mikroskopische Verfahren können Anhaltspunkte über die genauere Lokalisation und somit auch mögliche Funktion von Proteinen liefern. Anhand von hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Verfahren könnte zum Beispiel zwischen einer gleichmäßigen Verteilung von cry3-GFP in den Organellen und einer Anreicherung an/in speziellen Strukturen unterschieden werden. Essentiell ist dafür ein deutliches Signal des fluoreszierenden Fusionsproteins, welches gut vom Hintergrund unterschieden werden kann. In Bezug auf die Hintergrundfluoreszenz ist es essentiell, stets geeignete Kontrollen in die Untersuchungen einzuschließen. Neben der starken Autofluoreszenz von Chlorophyll ist in Chloroplasten auch die deutliche Fluoreszenz anderer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bei verschiedenen Wellenlängen zu beachten.

Zunächst sollte versucht werden die GFP-Fluoreszenz in Blattmaterial der cry3-GFP exprimierenden Linie zu visualisieren. Im *Western blot* konnte ein deutliches Signal für das Fusionsprotein detektiert werden (siehe Abbildung 3.8c). Um die Hintergrundfluoreszenz so gering wie möglich zu halten, wurde Blattmaterial von adulten Pflanzen sowie wenige Tage alte Keimlinge protoplastiert. Im Epifluoreszenzmikroskop war allerdings ausschließlich die Autofluoreszenz des Chlorophylls zu erkennen (siehe Abbildung 3.9). Auch der Versuch, eine mit Chloroplasten angereicherte Fraktion im KLSM genauer zu betrachten, zeigte kein verwertbares Signal für cry3-GFP. Zwar war bei entsprechender Anregung und Detektionswellenlänge für GFP ein schwaches Signal zu erkennen, doch war dies nicht von dem als Kontrolle verwendeten Wildtyp *Ler* zu unterscheiden. Transformiert man hingegen Protoplasten einer *Arabidopsis*-Zellkultur transient, so dass in diesen

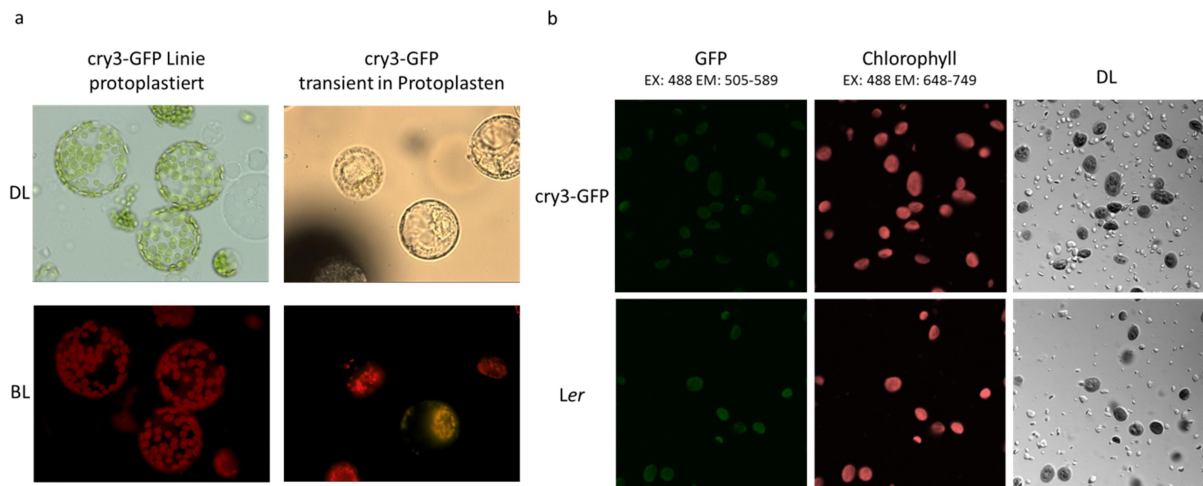


Abbildung 3.9 Transient transformierte Protoplasten exprimieren cry3-GFP.

(a) Blattmaterial der cry3-GFP exprimierenden Linie wurde protoplastiert bzw. Protoplasten einer grünen Zellkultur transient mit cry3-GFP transformiert. Gezeigt ist die Durchlichtaufnahme (DL) und die Fluoreszenz bei Anregung mit Blaulicht (BL) im Epifluoreszenzmikroskop (Bx51 von Olympus). (b) Aus Rosettenblättern der cry3-GFP-Linie sowie des Wildtyps *Ler* wurden Chloroplasten aufgereinigt. Die Anregung im KLSM (Leica TCS SP2) erfolgte mit 488 nm und die Detektion bei 505-589 nm für GFP (in grün dargestellt) und 648-749 nm für die Chlorophyllautofluoreszenz. Außerdem ist die entsprechende Durchlichtaufnahme gezeigt (DL).

cry3-GFP exprimiert wird, ist ein deutliches Signal in den Organellen zu erkennen. Im Epifluoreszenzmikroskop erscheint dieses deutlich gelb, was durch die Überlagerung des grünen GFP Signals und der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls zustande kommt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Protoplasten aus *Arabidopsis* Zellkultur ergeben sich allerdings einige Nachteile. So ist die Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Belastung und starkem Licht zu beachten. Hochauflösende mikroskopische Verfahren benötigen allerdings im Allgemeinen sehr starke Lichtquellen, die in den Protoplasten zu Photoschäden führen können. Zudem sind die Chloroplasten im Vergleich zu denen aus frisch protoplastierten Blättern sehr klein, was solche Studien erschwert, die eine genauere Lokalisation innerhalb der Organellen zeigen sollen.

Alternativ wurde deshalb eine Fusion von cry3 mit YFP verwendet. YFP zeigte eine etwas stärkere Fluoreszenz als GFP und die Hintergrundfluoreszenz in Chloroplasten ist in dem Emissionspeak von YFP minimal (λ scan mit KLSM Leica TCS SP2). Das Ergebnis einer transienten Transformation dieses Konstrukts in Tabakblättern ist in Abbildung 3.10 gezeigt. Neben cry3-YFP wurde auch ein Konstrukt aus mCherry und einer NLS inseriert, um den Zellkern sichtbar zu machen (siehe Abbildung 3.10a). Deutlich zu sehen ist, dass das YFP Signal nicht ausschließlich in den Organellen auftaucht, sondern auch im Cytoplasma und im Zellkern. Dabei scheint cry3-YFP in einem Punkt im Zellkern besonders stark angereichert, welcher hingegen kaum mCherry-NLS aufweist.

In Abbildung 3.10b ist Tabak zu sehen, der ausschließlich das Cryptochrom und kein mCherry-NLS

exprimiert. Die Exzitationswellenlänge wurde so gewählt, dass sowohl YFP als auch Chlorophyll damit angeregt werden. Die ausgewählten Aufnahmen zeigen eine Zelle in zwei unterschiedlichen Fokusebenen. In der ersten (F1) ist im Durchlicht der Zellkern deutlich zu erkennen, während in der zweiten Ebene (F2) der Fokus auf den Chloroplasten liegt, die sich um den Zellkern herum befinden. Die Chloroplasten sind deutlich an der Chlorophyllfluoreszenz zu erkennen (in rot dargestellt). YFP wurde in grün dargestellt, so dass eine Überlagerung beider Signale im *overlay* gelb erscheint. Auch hier zeigt sich die oben beschriebene Lokalisation im Zellkern und zudem in den Organellen. Die Verteilung von cry3-YFP in den Chloroplasten scheint nicht uniform zu sein, da deutliche punktförmige Anreicherungen zu erkennen sind, die im *overlay* besonders gut als gelbe Punkte auf rotem Hintergrund zu erkennen sind.

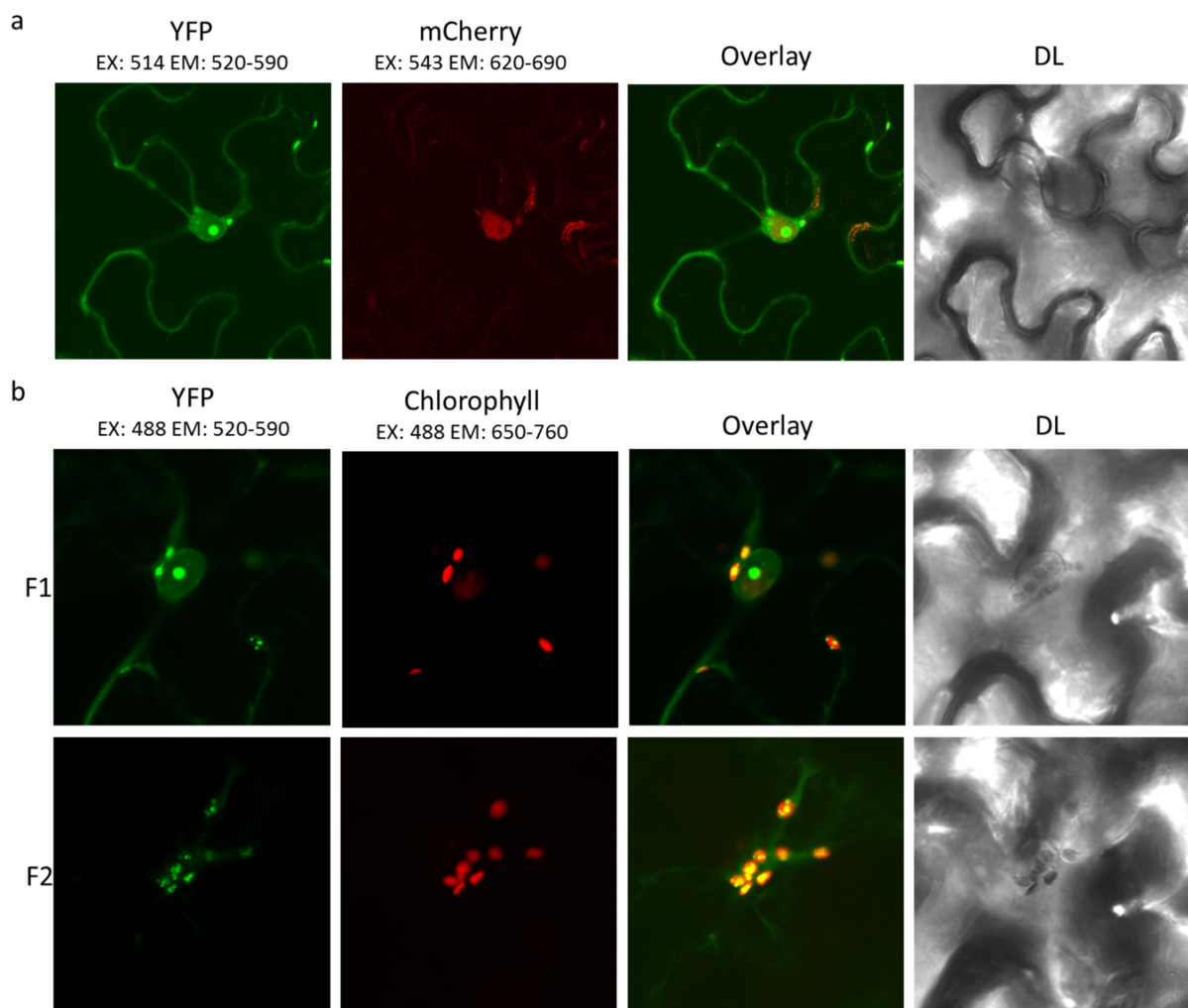


Abbildung 3.10 Cry3-YFP lokalisiert im Zellkern und den Chloroplasten von Tabak.

Tabakblätter wurden durch Infiltration mit Agrobakterien transformiert, die die binären Plasmide cry3-YFP/pFGC5941 und in **a** ebenfalls pB7-ABAspro-mCherryNLS trugen. Die Aufnahmen erfolgten mit dem KLSM Leica TCS SP2, die verwendeten Anregungswellenlängen (EX) und der Bereich in dem die Emission detektiert wurde (EM) sind angegeben und wurden zur Detektion von YFP, mCherry oder Chlorophyll verwendet. Die beiden Kanäle wurden übereinander gelegt (*overlay*) und das Durchlichtbild (DL) ist gezeigt. In **b** wurde eine Zelle in zwei Fokusebenen (F1 und F2) aufgenommen.

3.3 Phänotypen der *cry3* Mutante

Aufschluss über die Funktion eines Zielproteins kann die Untersuchung von genetisch veränderten Linien geben, in welchen dieses Protein nicht (*knock-out* Mutante) oder in sehr großer Menge (Überexpressionslinie) exprimiert wird. Verfügbare *cry3* Mutanten und Überexpressionslinien wurden von Stefan Reisbacher näher beschrieben (Reisbacher, 2009). Als *cry3* Mutante wird hier die Transposon-Insertionslinie von RIKEN bezeichnet. Dies ist die einzige verfügbare Linie, in der kein *cry3* Transkript detektierbar ist.

3.3.1 Die *cry3* Mutante zeigt ein verändertes Verhalten während der blaulichtabhängigen Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums

In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Deletion von *cry3* Einfluss auf das Hypokotyllängenwachstum in *Arabidopsis* Keimlingen hat. Wurden Keimlinge unter mäßig starkem Blaulicht mit $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ angezogen, waren die Hypokotyle der *cry3* Mutante nach 96 Stunden etwa 20% länger als die des Wildtyps Nossen (Masterarbeit Tanja Göbel). Dies deutet darauf hin, dass *cry3* einen positiven Einfluss auf die blaulichtabhängige Deetiolierung von Keimlingen hat. Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp durch die Expression von *cry3*-HA komplementiert werden kann, wiederholte Maribel Dionisio-Sese das Experiment unter Blaulicht mit Fluenzraten von 0,1 bis $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (siehe Anhang Abbildung 6.1). Neben der *cry3* Mutante und dem Wildtyp untersuchte sie dabei die *cry3*-HA Überexpressionslinien Linien Nr. 5, 7, 9 und 10 im *cry3* Hintergrund (siehe auch Abbildung 3.4). Zwar konnte sie den oben beschriebenen Phänotyp reproduzieren, die *cry3* Mutante zeigte eine schwächere blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums. Doch hatte die Expression von *cry3*-HA keinerlei Einfluss auf das Wachstum. Die untersuchten Überexpressionslinien wiesen das gleiche Verhalten wie die Mutante auf. Unter schwachem Blaulicht waren die Hypokotyle der *cry3*-HA exprimierenden Pflanzen sogar etwas länger als die der *cry3* Mutante.

Es kann unterschiedliche Erklärungen dafür geben, dass der beschriebene Phänotyp offensichtlich nicht komplementiert wird. Um dies genauer zu beleuchten, wurde die blaulichtabhängige Deetiolierung in weiteren *Arabidopsis*-Linien untersucht. Die Keimlinge wurden dafür nach Stratifikation für 4 Tage im Dunkeln oder unter $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Blaulicht angezogen. In Abbildung 3.11 ist das Verhältnis von Blaulicht zu Dunkelprobe in % dargestellt, im Anhang in Abbildung 6.2 sind die absoluten Hypokotyllängen in cm und die relativen Werte im Vergleich der transgenen Linien zum jeweiligen Wildtyp dargestellt. Untersucht wurden die Überexpressionslinien von *cry3* ox6-3, ox4, ox7 (Reisbacher, 2009) sowie von *cry3*-HA die Linien HA1, HA4 und HA7

(vergleiche Abbildung 3.4) im *Ler* Hintergrund. Zwar zeigten sich Unterschiede in den relativen Hypokotyllängen, doch zeigte ein durchgeführter t-Test, dass diese nicht signifikant sind.

Die unter gleichen Bedingungen von Maribel Dionisio-Sese erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 3.11b dargestellt. Wie bereits beschrieben sind die relativen Hypokotyllängen in der *cry3* Mutante sowie der *cry3*-HA exprimierenden Linien im Mutanten-Hintergrund deutlich länger als im korrespondierenden Wildtyp Nossen.

Andere Nullmutanten für *cry3* sind zwar nicht verfügbar, doch gibt es die Linie GB#12, in welcher eine verkürzte Version von *cry3* exprimiert wird bei der die letzten 40 Aminosäuren fehlen. GB#12 befindet sich im Col-0 Hintergrund. Es fällt auf, dass dieser Wildtyp wesentlich stärker auf Blaulicht reagiert. Die Hypokotyle der Col-0 Keimlinge sind im Verhältnis zum Dunkelwert unter Blaulicht deutlich kürzer als bei Nossen und *Ler*. Im Vergleich zu dem hier verwendeten Col-0 Saatgut zeigt die GB#12 Linie ein signifikant längeres Hypokotyl, was dem Verhalten der *cry3* Mutante entspricht. Allerdings war dieses Ergebnis nicht immer reproduzierbar (siehe Anhang Abbildung 6.33) und auch von der verwendeten Col-0 Nachzucht abhängig. Im Vergleich zu Nossen zeigte Col-0 im ersten Experiment ein etwa 12% kürzeres Hypokotyl, also eine stärkere Inhibierung durch Blaulicht. Im

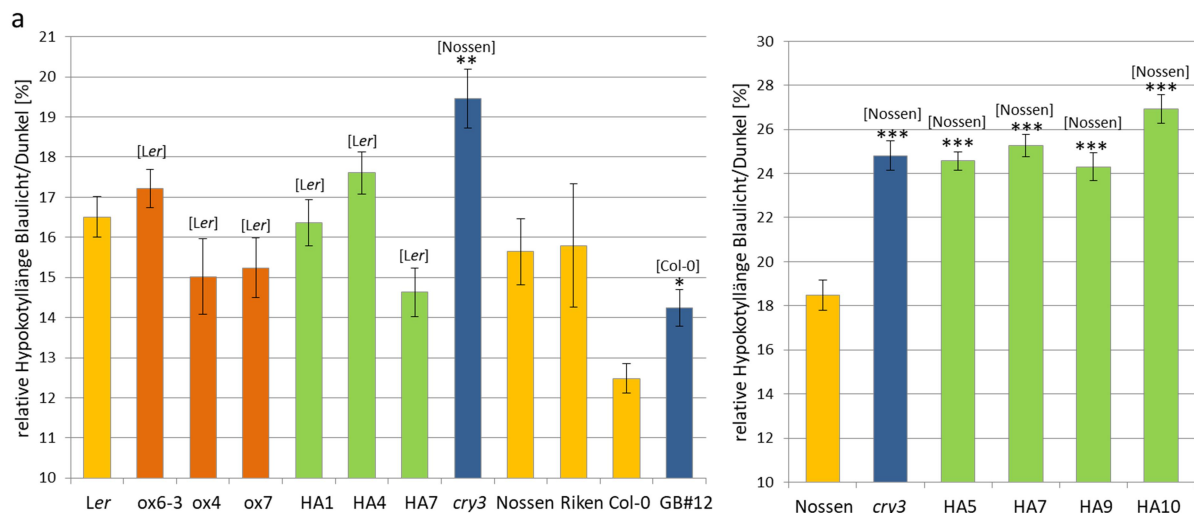


Abbildung 3.11 Blalichtabhängige Inhibition des Hypokotyllängenwachstums.

Arabidopsis-Keimlinge wurden nach Stratifikation für 4 Tage im Dunkeln bzw. unter Blaulicht ($10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten angezogen. Jeweils 20 Keimlinge wurden fotografiert und mit Image J vermessen (auf Grund der schlechten Keimung für *ox4* mindestens 14 und RikenWT (Riken) mindestens 6 Keimlinge). Die Blaulichtproben wurden durch den Mittelwert der Dunkelprobe geteilt, der sich daraus ergebende Mittelwert sowie der Standardfehler sind in % dargestellt. Untersucht wurden die Wildtypen *Ler*, Nossen und Col-0, die Transposon-Insertion von Riken (*cry3*) und die T-DNA Insertion von GABI-Kat (GB#12) (im Col-0 Hintergrund). Außerdem ist in **a** die Überexpression von *cry3* (*ox6-4*, *ox4*, *ox7*) und *cry3*-HA (HA1, HA4, HA7) im *Ler* Hintergrund gezeigt und in **b** die von *cry3*-HA (HA5, HA7, HA9, HA10) im *cry3* Hintergrund. Bei RikenWT (Riken) handelt es sich um Saatgut, welches durch Selbstung der heterozygoten *cry3* Mutante und Selektion auf das Wildtyp-Allel erhalten wurde. Die Anzucht und Messungen in **b** wurden von Maribel Dionisio-Sese vorgenommen. Mittels t-Test wurden die transgenen Linien mit den jeweiligen Wildtypen verglichen (in eckigen Klammern angegeben), signifikante Unterschiede sind mit * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet.

zweiten Experiment war dieser Unterschied nicht mehr zu beobachten. Die Linie GB#12 zeigte in beiden Fällen nur geringe Abweichungen vom Wildtyp Nossen und somit nur im ersten Experiment eine schwächere blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums im Vergleich zu dem verwendeten Col-0 Wildtyp. In den beiden Experimenten wurde für Nossen, die *cry3* Mutante und GB#12 das gleiche Saatgut verwendet, lediglich für Col-0 wurde eine spätere Nachzucht eingesetzt.

Eine weitere untersuchte Linie wird hier als Riken-Wiltyp Linie (RikenWT) bezeichnet. Das heterozygote *cry3*-Saatgut wurde geselbstet und auf das homozygote Wildtyp Allel hin selektioniert. Genetisch sollte sich diese Linie also nicht von dem Nossen Wildtyp unterscheiden, der als Hintergrund der *cry3* Mutante angegeben wurde. Tatsächlich ist in Bezug auf die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums durch Blaulicht kein Unterschied zwischen Nossen und RikenWT zu erkennen.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass nur die Linien, die das pflanzeigene *cry3* nicht oder in verkürzter Form exprimieren, eine schwächere blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums aufweisen als der entsprechende Wildtyp. Die Überexpression von *cry3* übt hierauf keinen Einfluss aus. Findet die Expression im Wildtyp-Hintergrund statt, unterscheiden sich die Hypokotyllängen von Wildtyp und Überexpressionslinie nicht signifikant. Wird die HA-markierte Variante des Proteins in der Mutante exprimiert, verhält sich die Linie genau wie die *cry3* Mutante und konnte diesen Phänotyp folglich nicht komplementieren.

3.3.2 Einfluss von *cry3* auf das Chloroplastenproteom

Da *cry3* in Chloroplasten lokalisiert ist, sollte untersucht werden, ob die Deletion oder Überexpression dieses Proteins einen Einfluss auf das Proteom der Organellen hat. Hierfür wurden zunächst Chloroplasten aus Blattmaterial adulter Pflanzen (9 Wochen alt, unter Kurztagbedingungen gewachsen) von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp bzw. der *cry3* Mutante sowie der Überexpressionslinie (*cry3ox6-3*) aufgereinigt. Um differentiell exprimierte Proteine zu identifizieren, wurden CyDye DIGE Fluors (GE Healthcare) zum Markieren der unterschiedlichen Proben verwendet und diese anschließend mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt

3.3.2.1 Das Fehlen von *cry3* beeinflusst die Menge einiger Chloroplastenproteine

Für die *cry3*-Überexpressionslinie und die *cry3* Mutante wurden jeweils sechs DIGE Analysen mit unabhängigen Chloroplastenextrakten durchgeführt. Die transgenen Linien wurden dabei mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen und die Markierung mit den CyDyes erfolgte in Abwesenheit von DTT, welches erst direkt vor der isoelektrischen-Fokussierung (IEF) zugegeben wurde. Die IEF erfolgte

über einen pH-Bereich von 4 bis 7, da dies die beste Auftrennung der verwendeten Extrakte ergab (siehe Anhang Abbildung 6.4).

Die *cry3*-Überexpressionslinie zeigte im Vergleich zum *Ler* Wildtyp keine unterschiedlich stark auftretenden Spots, was darauf hindeutet, dass die Überexpression unter den gegebenen Bedingungen und Möglichkeiten der Detektion keinen Einfluss auf das Chloroplastenproteom hat. Die Deletion von *cry3* führte hingegen zu insgesamt 19 im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimierten Spots. Als signifikant unterschiedlich wurden dabei Spots angenommen, die einen Unterschied in der Intensität der Spots von größer als 1,5 aufwiesen, auf mindestens 4 der 6 Gelen detektiert wurden und bei denen ein t-Test ein $p < 0,05$ ergab. Die Coomassiefärbung eines repräsentativen Gels ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Die differentiellen Spots sind mit Nummern markiert. Eine blaue Zahl zeigt eine Anreicherung in der *cry3* Mutante und eine rote eine Abreicherung an.

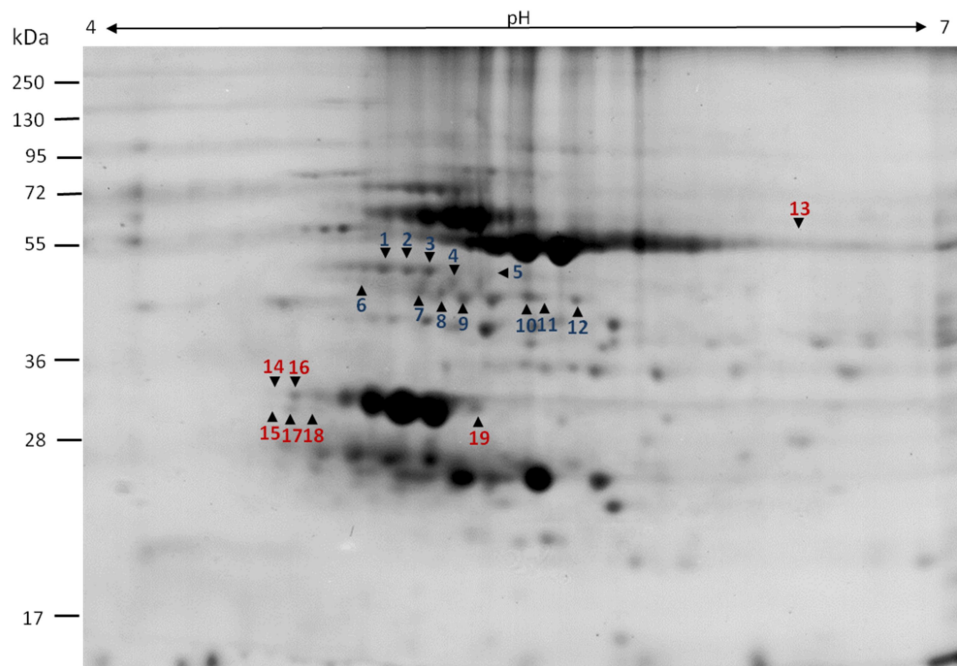


Abbildung 3.12 Differentiell regulierte Spots in der *cry3* Mutante.

Die Chloroplasten wurden aus ca. 9 Wochen altem Blattmaterial von dem *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Nossen sowie der *cry3* Mutante isoliert. Insgesamt wurden 6 unabhängige Chloroplastenextrakte untersucht. Die Proteine wurden mit PEG- Puffer extrahiert und anschließend mit TCA/Aceton präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in Rehydrationspuffer ohne DTT solubilisiert und mit CyDyes markiert (der Standard (eine Mischung aller im Experiment vorkommenden Chloroplastenproteinproben) mit Cy2 und Wildtyp bzw. Mutante mit Cy3 oder Cy5. Vor der IEF mit IPG Strips pH 4 bis 7 wurde DTT (Endkonzentration 100 mM) zugegeben. Die zweite Dimension stellte eine SDS-PAGE über 12% Polyacrylamid-Gele dar. Die Visualisierung der CyDyes erfolgte mit einem Typhoon® Scanner bei 633 nm (670 nm Bandpassfilter) für Cy5, 532 nm (580 nm Bandpassfilter) für Cy3 und 488 nm (520 nm Bandpassfilter) für Cy2. Die Auswertung erfolgte mit der DeCyder™ (GE Healthcare) Bildanalyse-Software. Zur Identifikation von signifikant regulierten Spots wurde das *Biological Variation Analysis* (BVA) Modul verwendet. Es mussten folgende Kriterien erfüllt werden: die Änderung musste größer 1,5 sein, die Spots mussten auf mindesten vier der sechs Gele detektierbar sein und in dem durchgeführten t-Test musste $p < 0,05$ sein. Die so erhaltenen Spots sind mit Pfeilen auf einem repräsentativen Gel (mit kolloidalem Coomassie gefärbt) markiert und nummeriert. Eine blaue Zahl zeigt dabei eine Anreicherung in der Mutante und eine rote eine Abreicherung an.

Die differentiell regulierten Spots wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Proteine massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF MS bzw. MS/MS identifiziert. Insgesamt wurden so 10 unterschiedliche Proteine entdeckt. Einzig für Spot Nr. 13 konnte kein Protein gefunden werden, da hier die Menge an Peptiden nicht ausreichte, um diese mit der verwendeten Methode zu identifizieren. Eine Liste der differentiell exprimierten Proteine ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Die bei der Datenbankabfrage mit Mascot erhaltenen Scores und weitere Information zur Identifikation sind im Anhang in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Die Sortierung der Proteine erfolgte entsprechend der Nummerierung in Abbildung 3.12. Fast zweidrittel der Spots (1 bis 12) waren in der Mutante hochreguliert und nur die Spots 13 bis 19 im Wildtyp stärker repräsentiert.

Einige der identifizierten Proteine konnten in mehreren Spots detektiert werden, so konnten z.B. die Spots 1 bis 3 als Spliceform 1 und die Spots 10 bis 12 als Spliceform 2 der RuBisCO-Activase (RA) identifiziert werden, diese werden im Folgenden als RA1 und RA2 bezeichnet. Die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) konnte in drei Spots (6 bis 8) und die Phosphoribulokinase (PRK) in zwei Spots (8 und 9) detektiert werden, wobei in Spot 8 eine Mischung beider Proteine zu finden war. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Spots 14 und 18, denen zwei bzw. drei unterschiedliche Proteine zugeordnet werden konnten. Eine Unterscheidung zwischen den zwei Proteinen des *oxygen evolving enhancer complex* des Photosystems II (PSBO1 und PSBO2) war auf Grund der hohen Sequenzhomologie nur in Spot 19 möglich. Hier konnte das Protein als PSBO2 identifiziert werden. In den in Spots 14 und 18 detektierten Mischungen konnte zwischen den beiden stark verwandten Proteinen hingegen nicht unterschieden werden. In diesem Bereich des Gels konnten außerdem die Plastid-Lipid assoziierten Proteine PAP1, PAP2 und PAP6 detektiert werden. PAP1 und PAP2 konnten jeweils in einem bzw. zwei individuellen Spots, sowie in der Mischung in 14 bzw. 18 detektiert werden. PAP6 konnte hingegen nur in der Mischung in Spot 18 detektiert werden. Während die berechneten Molekulargewichte für PAP1, PAP2, PSBO1 sowie PSBO2 zwischen 26,5 und 28,8 kDa liegen und sich die pls in einem Rahmen von 4,65 bis 5,0 bewegen, unterscheidet sich PAP6 mit 22,9 kDa und einem pl von 5,32 deutlich von diesen, was die Kolokalisation auf dem Gel überraschend erscheinen lässt. Das Auftreten von Proteinen in mehreren Spots, teilweise mit starken Abweichungen von den theoretischen Werten für Molekulargewicht bzw. pl, ist jedoch für 2D Gele nicht ungewöhnlich und lässt sich z.B. durch posttranskriptionelle Modifikationen, wie Phosphorylierungen erklären (Halligan *et al.*, 2004).

Tabelle 3.1 In der *cry3* Mutante differentiell exprimierte Proteine.

Die in Abbildung 3.12 markierten Spots wurden mit MALDI-TOF MS identifiziert. Die mittlere Änderung gibt an, um das wie vielfache der entsprechende Spot im Vergleich zum Wildtyp in der Mutante über- bzw. unterrepräsentiert war. Die wichtigsten Funktionen der Proteine wurden TAIR entnommen und sind stichwortartig aufgeführt.

Spot Nr.	mittlere Änderung	t-Test	Protein	Locus	Funktion
1	1,52	2,8E-05	RA spliceform 1	At2g39730	lichtabhängige Aktivierung von RbcL, Jasmonat-induzierte Blattseneszenz
2	1,74	1,4E-06	RA spliceform 1	At2g39730	siehe 1
3	1,67	1,1E-05	RA spliceform 1	At2g39730	siehe 1
4	1,51	0,0014	GLN2	At5g35630	Photorespiration
5	1,52	0,0043	EFTU	At4g20360	Translationselongation
6	1,61	0,026	PGK 1 (fragment)	At3g12780	Calvinzyklus, Glykolyse
7	1,59	0,0016	PGK 1	At3g12780	siehe 6
8	1,67	0,001	PGK1 (fragment)	At3g12780	siehe 6
9	1,75	0,00033	PRK	At1g32060	Calvinzyklus
10	1,7	0,0012	PRK	At1g32060	siehe 8
11	1,81	0,0025	RA spliceform 2	At2g39730	siehe 1
12	1,65	0,0035	RA spliceform 2	At2g39730	siehe 1
13	-1,72	0,035	?		
14	-1,57	0,0033	PAP1	At4g04020	An Abscisinsäure vermitteltem Lichtschutz beteiligt
			PSBO1/2	At5g66570 At3g50820	Lichtreaktion der Photosynthese, Teil des sauerstoffreisetzender Komplex des PSII
15	-2,36	0,0038	PAP2	At4g22240	Strukturmolekül
16	-1,63	0,0057	PAP1	At4g04020	siehe 14
17	-1,74	0,016	PAP2	At4g22240	siehe 15
			PAP2	At4g22240	siehe 14
18	-1,58	0,0063	PSBO1/2	At5g66570 At3g50820	siehe 14
			PAP6	At3g23400	Strukturmolekül
19	-1,51	0,003	PSBO2	At3g50820	siehe 14

3.3.2.2 Die Ergebnisse der 2D-DIGE können durch quantitative *Western blots* reproduziert werden

Die 2D-DIGE zeigte, dass *cry3* einen Einfluss auf die Abundanz einiger Chloroplastenproteine hat. Gegen einige dieser Proteine sind Antikörper verfügbar, was die Möglichkeit eröffnete, deren relative Menge auch im *Western blot* zu bestimmen. Kommerzielle Antikörper waren von Agrisera gegen RA1 und RA2, GLN2, PRK, Pap1 und auch PSBO erhältlich. Auf die Untersuchung von letzterem wurde allerdings verzichtet. Der Grund dafür war, dass die drei prominenten Proteinspots zwischen den Markierungen 18 und 19 (siehe Abbildung 3.12) ebenfalls als PSBO identifiziert worden waren, jedoch keine Änderung in Abhängigkeit von *cry3* zeigten. Bei eindimensionaler Auftrennung wäre es unmöglich zwischen diese Proteinformen zu unterscheiden und somit einen Einfluss von *cry3* auf PSBO Gehalte herauszuarbeiten.

Bei der Quantifizierung von *Western blots* ist es essentiell, eine Möglichkeit zur Normierung des Signals zu haben. Hier wurde zu diesem Zweck die auf dem Gel geladene Gesamtmenge an Protein bestimmt. Die Membran wurde hierfür mit *Deep purple™ Total Protein Stain* (GE Healthcare) gefärbt und gescannt (Typhoon® scanner, GE Healthcare) bevor mit der Immunodetektion fortgefahren wurde (siehe Abbildung 3.13a). Auf die Detektion eines Proteins, welches als *house keeper* fungiert, wurde verzichtet, da auch der Einfluss von Licht untersucht werden sollte und mir kein Chloroplastenprotein bekannt ist, welches nicht direkt oder indirekt durch Licht beeinflusst wird.

In Abbildung 3.13a sind die Ergebnisse von Versuchen gezeigt, bei denen 20, 10 und 5 µg Chloroplastenproteinextrakte des Wildtyps und der *cry3* Mutante mittels *Western blot* untersucht wurden. Nach erfolgtem Transfer und Färbung mit *Deep purple™ Total Protein Stain* (GE Healthcare) erfolgte die Immunodetektion mit Antikörpern gegen RA und Pap1. Die Gesamtproteinfärbung macht deutlich, dass sich die Lademengen zwischen Mutante und Wildtyp nur geringfügig unterscheiden. Wie auch schon in der 2D-DIGE enthält *cry3* deutlich mehr RA und weniger Pap1. Besonders gut ist dies in den Spuren zu erkennen in denen nur 5 µg Probe geladen wurde.

Beide Splicevarianten der RA werden von dem Antikörper erkannt, sind aber auch auf dem eindimensionalen Gel gut voneinander zu unterscheiden und wurden daher auch getrennt quantifiziert. Die obere Bande entspricht dabei der Spliceform 1 und die untere der kleineren Variante 2 (kurz RA1 und RA2).

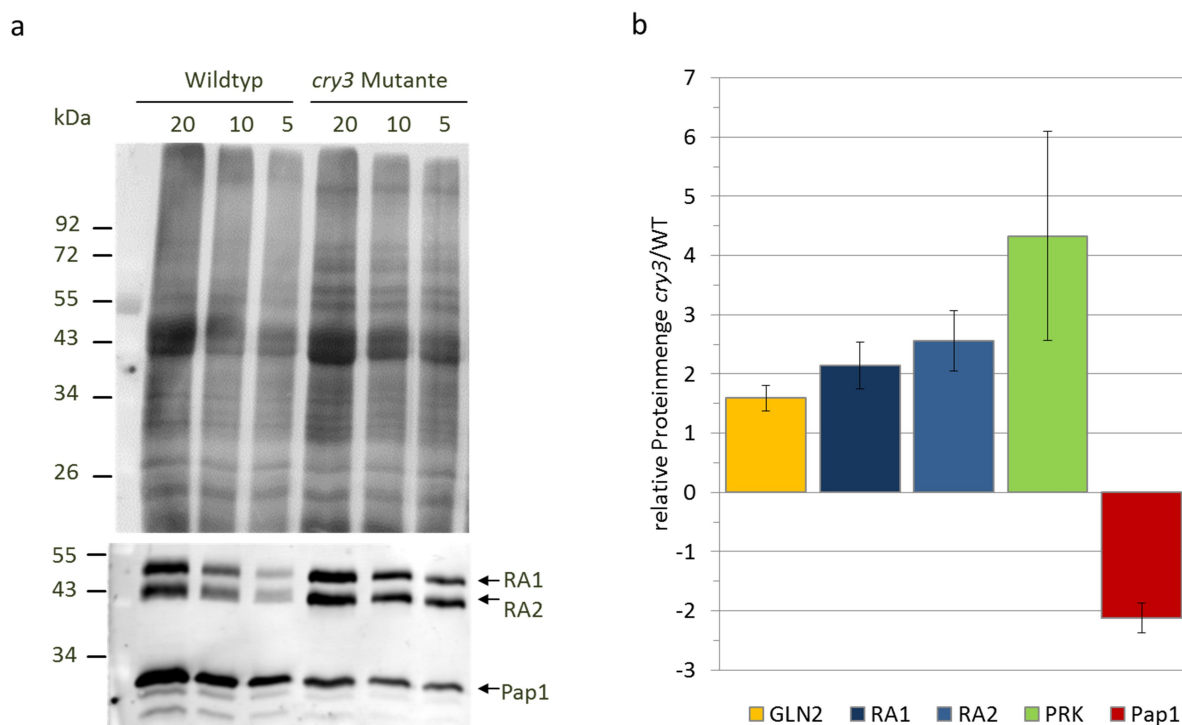


Abbildung 3.13 Quantitative *Western blots* zeigen Einfluss von *cry3* auf die Menge spezifischer Chloroplastenproteine.

Aus adulten, im Kurztag gewachsenen Pflanzen des Wildtyps Nossen und der *cry3* Mutante wurden eine Stunde nach Tagesanbruch Chloroplasten isoliert und die Proteine in PEG Puffer extrahiert. 20, 10 und 5 µg Protein wurden aufgetrennt und mittels *Western blot* auf PVDF Membranen übertragen, mit *Deep purple™ Total Protein Stain* (GE Healthcare) gefärbt und dem Typhoon® Scanner visualisiert. Anschließend erfolgte die Immunodetektion mit Antikörpern von Agrisera gegen RA und Pap1(PGL35) (a), sowie GLN2 und PRK (b). Als sekundärer Antikörper wurde IRDye® 800CW *donkey anti-rabbit* (LI-COR Biosciences) verwendet und die Visualisierung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Odyssey® *infrared imaging system* (LI-COR Biosciences). (a) Die Gesamtproteinfärbung (oben), sowie die detektierten Proteinbanden (unten) sind exemplarisch dargestellt. (b) Die relative Gesamtproteinmenge in der Färbung mit *Deep purple™ Total Protein Stain* (GE Healthcare) wurde mit Image J bestimmt. Neben den zu quantifizierenden Extrakten wurde auf jedes Gel eine Proteinmischung als Standard geladen, so dass die Bestimmung der Signalstärke zunächst im Verhältnis zu diesem Standard erfolgte. Anschließend wurde die Änderung zwischen *cry3* und Nossen bestimmt. Die Mittelwerte aus fünf Chloroplastenproteinextrakten und die dazugehörigen Standardfehler sind gezeigt.

In Abbildung 3.13b sind die durch Image J quantifizierten Signalstärken gezeigt. Normiert wurde jeweils gegen einen Standard, der auf jedes Gel geladen wurde, um Unterschiede des Transfers zwischen den *Western blots* auszugleichen, und gegen die Gesamtproteinmenge einer Spur. Anschließend wurde die Änderung der relativen Proteinmenge in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Die Mittelwerte und Standardfehler aus fünf Proben sind aufgetragen. Die kleinste Änderung mit einem Faktor von 1,5 war für die GLN2 zu beobachten, was sehr genau dem in der 2D-DIGE erzielten Wert entspricht (vergleiche Tabelle 3.1). Auch für die RA1 und RA2 zeigt sich mit Änderungen zwischen 2 und 2,5 und für Pap1 mit etwa -2 eine mittlere Änderung, welche nur geringfügig größer ist als in der 2D-Gel basierenden Methode.

Für die PRK ist das Ergebnis hingegen nicht so eindeutig. Der Mittelwert zeigt zwar an, dass in der

cry3 Mutante die vierfache Menge dieses Proteins enthalten ist, doch ist der Standardfehler sehr groß. Die Detektion der PRK hat sich als schwierig herausgestellt, da der Antikörper nicht besonders sensitiv war oder die in den Proben enthaltenen Mengen des Proteins zu gering waren. Ein Signal mit erwarteter Größe konnte nur auf getrockneten Membranen und dem Scanner mit höchster Sensitivität beobachtet werden. Der so ebenfalls erhaltene starke Hintergrund macht eine Quantifizierung der Signale schwierig. In aufgetragenen Verdünnungsstufen zeigte sich kein guter linearer Zusammenhang zwischen Lademenge und Signalstärke, was zu der Erkenntnis führt, dass dieser Antikörper für eine Quantifizierung eher ungeeignet ist und somit in folgenden Untersuchungen darauf verzichtet wurde.

3.3.2.3 Die Mengen von RA und Pap1 unterscheiden sich in Gesamtextrakten der *cry3*-Mutante nicht deutlich vom WT

Um herauszufinden, ob der oben beschriebene Einfluss von *cry3* auf die Menge an spezifischen Chloroplastenproteinen lichtabhängig ist, wurden adulte *Arabidopsis* Wildtyp (Nossen) Pflanzen sowie die *cry3* Mutante zunächst für 4 Tage dunkeladaptiert. Anschließend wurden die Pflanzen mit Weißlicht (*cry3* Licht (CL) und Nossen Licht (NL)) bestrahlt oder im Dunkeln belassen (*cry3* dunkel (CD) und Nossen dunkel (ND)) und Proben nach 0, 1, 4 und 8 Stunden genommen. Die Bestimmung der relativen Mengen RA1, RA2 und Pap1 ist in Abbildung 3.14a bis c gezeigt und wie in 3.3.2.2 beschrieben. Abweichend wurde nicht gegen einen Standard, sondern die 0 Stundenprobe normiert und es wurden Proteingestamtextakte untersucht.

Die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Proben sowie die Standardfehler wurden aufgetragen (Abbildung 3.14a bis c). Bezieht man die Fehler in die Betrachtung mit ein wird deutlich, dass die Proteinmengen weder durch die Belichtung noch durch die Abwesenheit von *cry3* in den Gesamtextrakten beeinflusst werden. Beim Vergleich der jeweiligen Licht- und Dunkelproben fällt auf, dass sich frühestens nach 8 Stunden Unterschiede in der Proteinmenge zeigen. Allerdings ist keine der Änderungen größer als ein Faktor von 1,5 im Vergleich zum Ausgangswert. In diesem Pflanzenstadium und Zeitraum scheint Licht folglich kaum Einfluss auf die Expression dieser Proteine zu haben.

Überraschend ist der Umstand, dass kein Einfluss von *cry3* auf die Proteinmengen beobachtet werden konnte. Der größte Unterschied zu den vorher durchgeführten Untersuchungen ist, dass hier Gesamt- statt Chloroplastenextrakten verwendet wurden. Eine Messgröße, welche indirekt Rückschluss über die Menge an Chloroplasten geben kann, ist die Chlorophyllmenge, die in den Extrakten photometrisch bestimmt wurde. Die relativen Mengen an RA und Pap1, die gegen den Chlorophyllgehalt und nicht die Proteinmenge normiert wurden, sind in Abbildung 3.14d bis f

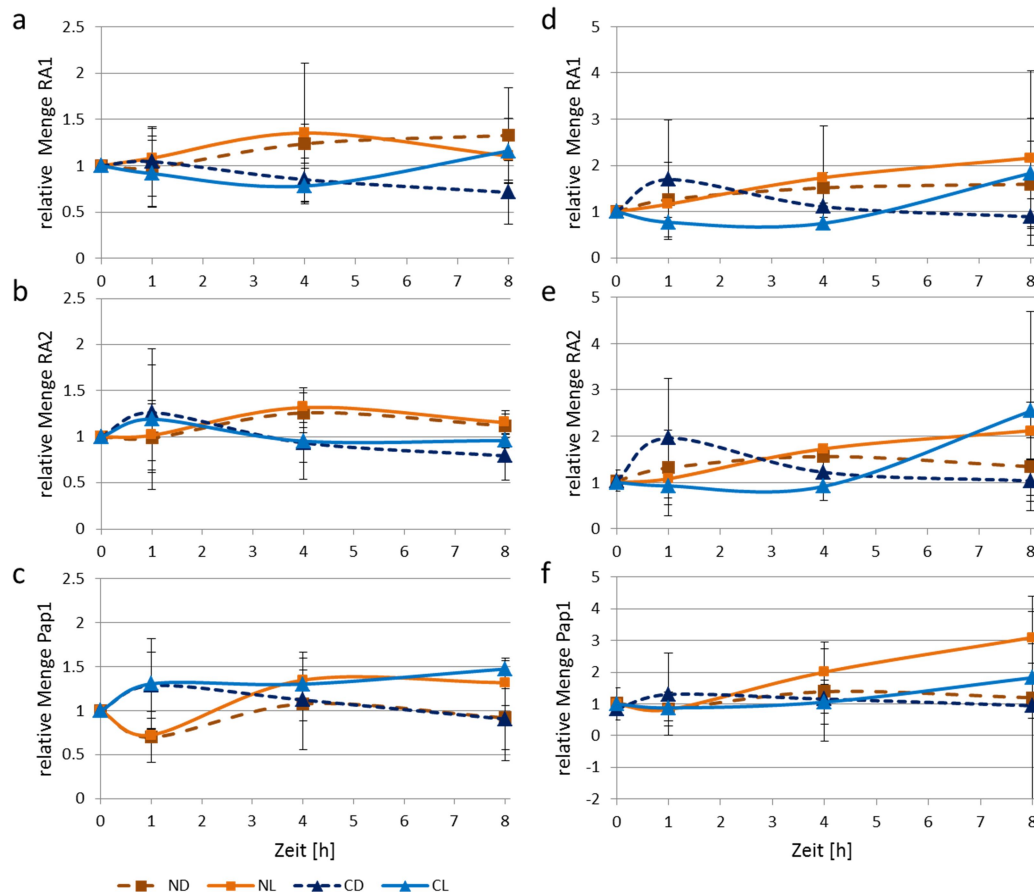


Abbildung 3.14 Lichtabhängige Expression von RA und Pap1.

Adulte, im Kurztag gewachsene Pflanzen des Wildtyps Nossen (N) und der *cry3* Mutante (C) wurden für 4 Tage dunkeladaptiert. Über einen Zeitraum von 8 Stunden wurden Blattproben genommen von Pflanzen, die entweder in Dunkelheit verblieben (ND und CD) oder mit Weißlicht bestrahlt worden waren (NL und CL). Proteingestamtextakte wurden hergestellt, mittels *Western blot* auf PVDF Membranen übertragen, mit *Deep purple™* gefärbt und mit dem Typhoon® Scanner visualisiert. Anschließend erfolgte die Immunodetektion mit Antikörpern von Agrisera gegen RA und Pap1(PGL35). Als sekundärer Antikörper wurde IRDye® 800CW donkey anti-rabbit (LI-COR Biosciences) verwendet. Die Visualisierung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Odyssey® infrared imaging system (LI-COR Biosciences). Die relative Gesamtproteinmenge in der *Deep purple™* Färbung wurde mit Image J bestimmt. Neben den zu quantifizierenden Extrakten wurde auf jedes Gel eine Mischung der eingesetzten Proben als Standard geladen, so dass die Bestimmung der Signalstärke zunächst im Verhältnis zu diesem Standard erfolgte. In **a** bis **c** wurden die Signale der Immunodetektion gegen die *Deep purple™* Färbung normiert. In **d** bis **f** wurde gegen die Chlorophyllmenge normiert, welche photometrisch in den Extrakten bestimmt wurde. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Messungen mit zugehörigen Standardfehlern gezeigt.

dargestellt. Zwar zeigen sich hier insgesamt größere Schwankungen im Kurvenverlauf, doch sind die Standardfehler so groß, dass keine verlässliche Aussage über einen Einfluss von *cry3* oder Licht auf die relativen Proteinmengen der untersuchten Chloroplastenproteine getroffen werden kann.

3.3.2.4 Der Einfluss von *cry3* auf die Menge spezifischer Chloroplastenproteine wird durch die Expression von *cry3*-HA in der *cry3* Mutante nicht komplementiert

In 3.3.2.2 wurde gezeigt, dass der Einfluss, den *cry3* auf die Häufigkeit einiger Proteine (GLN2, RA und Pap1) in Chloroplastenextrakten hat, mittels *Western blot* überprüft werden kann. Nun sollte untersucht werden, ob die Expression von *cry3*-HA in der Mutante den beschriebenen Effekt aufhebt. Ebenfalls untersucht wurde die Expression der Chloroplastenproteine in der *cry3*-GFP exprimierenden Linie und dem dazugehörigen Wildtyp *Ler*.

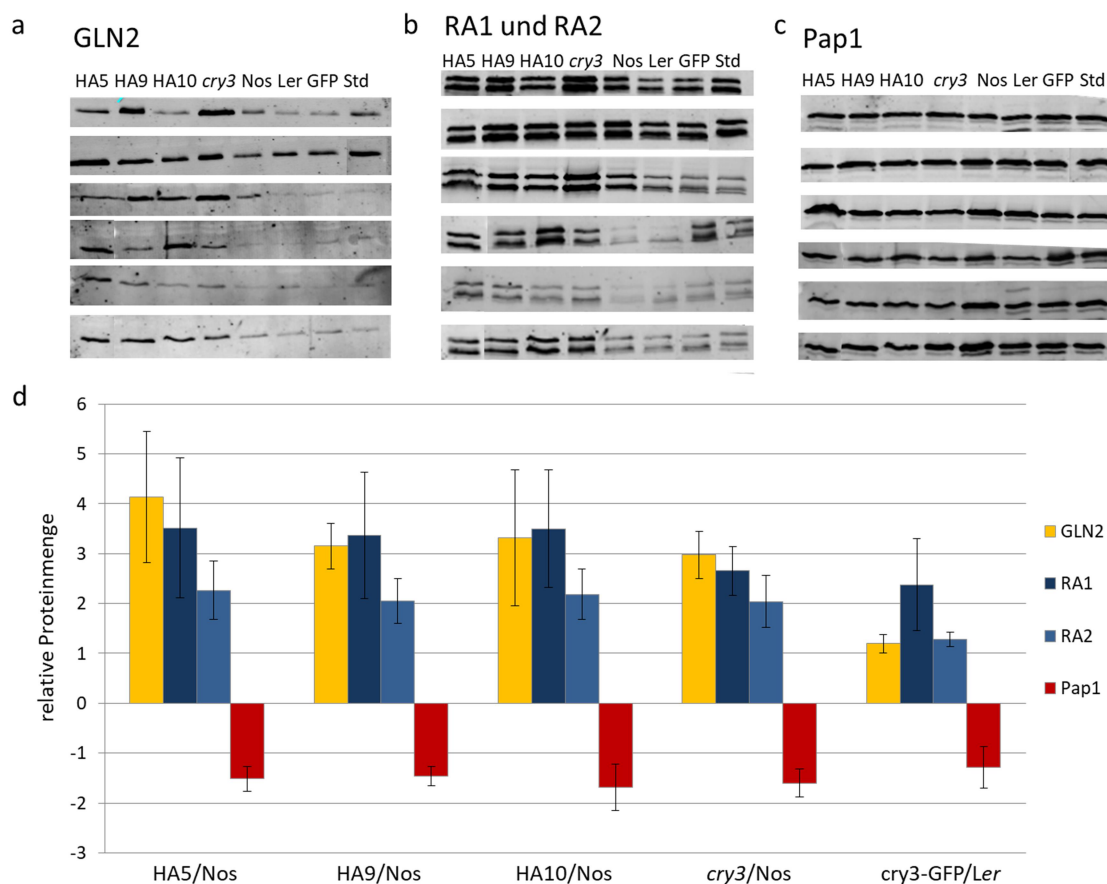


Abbildung 3.15 Quantitative *Western blots* zeigen veränderte Mengen an spezifischen Chloroplastenproteinen in der *cry3* Mutante, auch wenn in dieser *cry3*-HA exprimiert wird.

Aus adulten, im Kurztag gewachsenen Pflanzen der Wildtypen *Nossen* (*Nos*) und *Ler*, der *cry3* Mutante sowie der *cry3*-HA exprimierenden Linien im Mutanten Hintergrund (*HA5*, *HA9*, *HA10*) und der *cry3*-GFP Linie in *Ler* wurden eine Stunde nach Tagesanbruch Chloroplasten isoliert. Die Proteine wurden in PEG Puffer aus den Organellen extrahiert und mittels *Western blot* auf PVDF Membranen übertragen, mit *Deep purple™* gefärbt und mit dem Typhoon® Scanner (GE Healthcare) visualisiert. Anschließend erfolgte die Immunodetektion mit Antikörpern von Agrisera gegen GLN2, RA und Pap1 (PGL35). Als sekundärer Antikörper wurde IRDye® 800CW donkey anti-rabbit (LI-COR Biosciences) verwendet und die Visualisierung erfolgte mit dem Odyssey® infrared imaging system (LI-COR Biosciences) (a). Die in a gezeigten Signale sowie die relative Gesamtproteinmenge in der *Deep purple™* Färbung wurden mit Image J quantifiziert. Neben den Proben der unterschiedlichen Genotypen wurde auch eine Mischung dieser als Standard (Std) geladen. Die Bestimmung der Signalstärke erfolgte zunächst im Verhältnis zu diesem Standard, anschließend wurde die Änderung zwischen den angegebenen Linien bestimmt. In b sind die Mittelwerte aus sechs Chloroplastenroteinextrakten und die dazugehörigen Standardfehler gezeigt.

Die mit den jeweiligen Antikörpern erzielten Signale im *Western blot* sind in Abbildung 3.15a gezeigt. Die Quantifizierung erfolgte genau wie in 3.3.2.2 beschrieben und ist in b dargestellt. Es wurden insgesamt sechs Chloroplastenextrakte untersucht, eine Mischung aus allen Proben wurde als Standard geladen. Die Bedeutung dieses Standards wird deutlich, wenn man die *Western blot* Signale für GLN2 und RA betrachtet. Mit beiden Antikörpern sind die Signale in den ersten Blots deutlich stärker als in den Folgenden, während für Pap1 kaum ein Unterschied zu beobachten ist.

Vergleicht man die Signale der *cry3* Mutante mit denen des Nossen Wildtyps fällt für GLN2 und RA auf, dass die Signale in der Mutante stets stärker sind. Für Pap1 ist der Unterschied nicht ganz so deutlich zu erkennen, doch scheint sich hier das umgekehrte Verhältnis zu zeigen. Dies wird auch durch die Quantifizierung widerspiegelt. GLN2 ist in der Mutante etwa dreimal so stark vertreten wie im Wildtyp, RA etwa 2- bis 2,5-fach angereichert. Pap1 ist hingegen im Wildtyp stärker vertreten und dort um das 1,5-fache häufiger. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen aus 3.3.2.2 und der 2D-DIGE. Folglich lässt sich dieser gefundene Einfluss der *cry3* Mutante auf spezifische Chloroplastenproteine, trotz der relativ geringen Unterschiede, stabil reproduzieren.

Betrachtet man die *Western blots* für die *cry3*-HA exprimierenden Linien in Abbildung 3.15a, scheinen die Signalstärken in den einzelnen Extrakten größere Schwankungen aufzuweisen. Dies führt zu größeren Standardfehlern in der Quantifizierung (Abbildung 3.15b). Abgesehen davon entspricht das Verhalten jedoch annähernd dem der *cry3* Mutante: GLN2 und RA sind angereichert während Pap1 stärker im Wildtyp vertreten ist. Anders ist dies, wenn man die *cry3*-GFP Linie mit dem dazugehörigen Wildtyp *Ler* vergleicht. Hier wird neben dem GFP-markierten *cry3* auch das pflanzeigene Protein exprimiert. Für GLN2, RA2 und Pap1 unterscheidet sich die Signalstärke nicht nennenswert zwischen der *cry3*-GFP-Linie und dem Wildtyp. Lediglich für RA1 zeigt sich eine Anreicherung in der *cry3*-GFP-Linie mit einem Faktor von etwa 2, doch ist der Standardfehler sehr groß. Betrachtet man die *Western blots* (Abbildung 3.15a) wird deutlich, dass die große Änderung im Mittelwert hauptsächlich durch den großen Unterschied im vierten Chloroplastenextrakt zustande kommt. Während die GFP-Linie große Mengen RA1 enthält, ist dieses Protein in *Ler* kaum zu detektieren.

Ähnlich wie auch schon für den Einfluss von *cry3* auf die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums während der Deetiolierung von Keimlingen, ist auch der Einfluss von *cry3* auf die Häufigkeit bestimmter Chloroplastenproteine gut reproduzierbar. Eine Komplementation dieses Phänotyps ist durch die Expression von *cry3*-HA in der *cry3* Mutante jedoch nicht möglich (die Expression von *cry3*-HA ist in Abbildung 3.4 und die von *cry3*-GFP in Abbildung 3.1 gezeigt).

3.4 Interaktionspartner von cry3

Eine weitere Möglichkeit, mehr über die Funktion eines Proteins heraus zu finden, ist die Identifikation von Interaktionspartnern. Sollte cry3 tatsächlich als Photorezeptor fungieren so ist anzunehmen, dass das perzipierte Signal weitergeleitet wird, um Einfluss auf die Entwicklung und Anpassung der Pflanze zu nehmen. Eine naheliegende Vermutung ist dabei die direkte oder indirekte Interaktion mit anderen Proteinen, was hier mit Hilfe von CoIPs und einem Y2H library Screen untersucht wurde.

3.4.1 Co-Immunopräzipitation

Bei einer CoIP wird das Zielprotein mit Hilfe von Antikörpern an ein Trägermaterial gebunden. Die Antikörper können dabei entweder gegen das Protein selbst oder gegen einen an das Protein angefügten *tag* gerichtet sein. Bei geeigneten Bedingungen wird nicht nur das Zielprotein präzipitiert, sondern auch interagierende Proteine, welche nachfolgend massenspektrometrisch identifiziert werden können.

Da keine sehr spezifischen Antikörper gegen cry3 verfügbar waren, wurden die HA- und GFP-markierten Varianten von cry3 untersucht. cry3-HA wurde im cry3 Mutanten Hintergrund exprimiert und cry3-GFP im Ler Wildtyp. Zur Präzipitation von cry3-HA wurde der Anti-HA high Affinity Antikörper (Roche) Protein G *Dynabeads*[®] (Invitrogen) gebunden und chemisch mit diesen vernetzt. Um cry3-GFP spezifisch anzureichern, wurde GFP-Trap[®]M (Chromotek) verwendet. Da cry3 in Chloroplasten lokalisiert ist, wurden für die CoIPs diese Organellen aus adultem Blattmaterial isoliert. Um eine mögliche Interaktion nicht zu stören, wurde darauf geachtet, möglichst wenig Detergenz zu verwenden (maximal 0,5% NP-40) und auf ein Einfrieren des Blattmaterials sowie der Extrakte verzichtet. Die Identifikation von kopräzipitierten Proteinen sollte mittels ESI-MS stattfinden. Hierfür müssen die Zielproteine von den verwendeten *beads* getrennt werden. Eine oft angewendete Variante, um dies zu erreichen, ist eine starke Veränderung der pH-Werte, die zu einer Denaturierung der Antikörper und somit einer Auflösung der Bindung zum Antigen führt.

3.4.1.1 Cry3-HA und cry3-GFP können durch eine Änderung des pH-Werts nicht effektiv eluiert werden

In Abbildung 3.16a sind Versuche dargestellt, in denen die Elution von cry3-HA durch eine Veränderung des pHs versucht wurde. Dafür wurden Chloroplastenextrakte mit *beads* inkubiert, die Anti-HA Antikörper gebunden hatten (siehe auch MM 2.4.9.2). Nach einstündiger Inkubation bei 4°C

wurden die *Beads* siebenmal gewaschen und aliquotiert, um sie mit unterschiedlichen Verfahren zu behandeln. Ein Teil wurde direkt durch Aufkochen in SDS Probenpuffer eluiert. Es wurde sowohl vom Input als auch von der Probe 1/50 des Gesamtvolumen geladen. Während im Input ein deutliches Signal für cry3-HA zu erkennen ist, ist dieses für 1/50 des SDS-Eluats sehr schwach (siehe Abbildung 3.16a). Wurde 1/5 der Gesamtmenge geladen, zeigt sich ein sehr deutliches Signal, welches darauf schließen lässt, dass cry3-HA an die *beads* gebunden wurde. Die Elution mit niedrigem pH war hingegen wenig erfolgreich. Obwohl die gleiche relative Menge geladen wurde, ist im *Western blot* keine Bande erwarteter Größe zu erkennen. Ein Aufkochen der sauer-eluierten *beads* in SDS-Probenpuffer (sauer+SDS) führt zu einem sehr deutlichen Signal im *Western blot*.

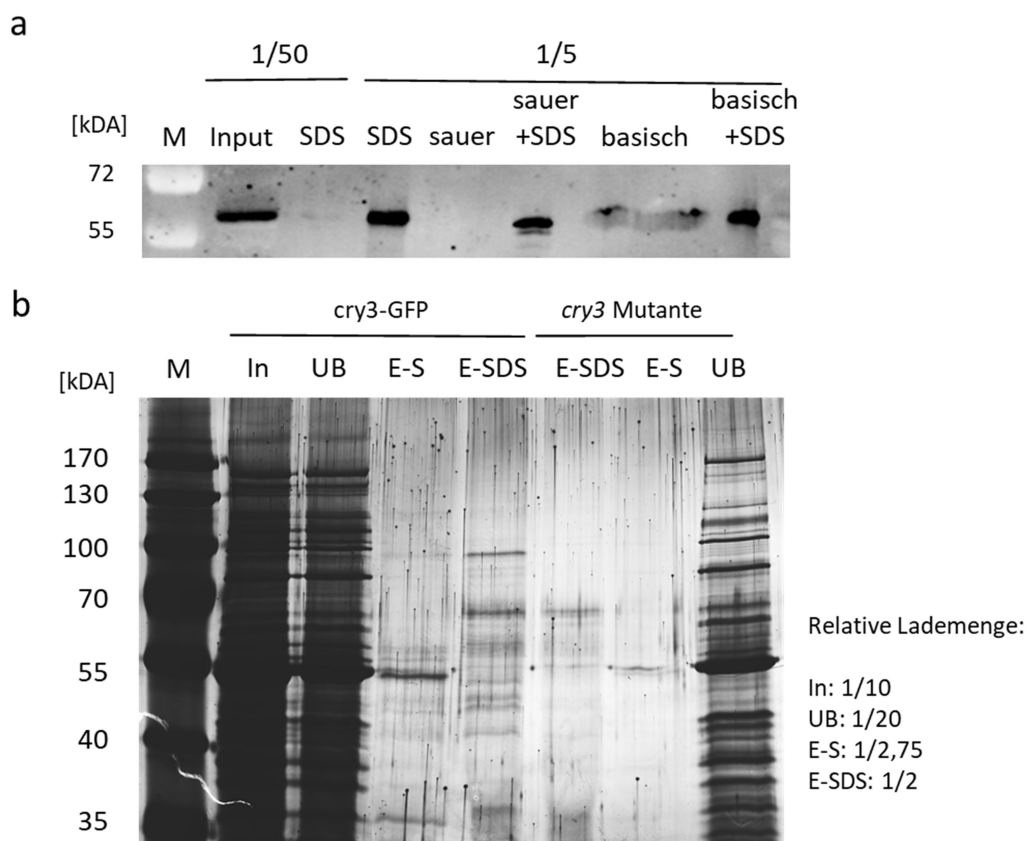


Abbildung 3.16 Die effektive Elution von cry3-HA und cry3-GFP in der CoIP gelingt nur mit SDS.

a An Protein G Dynabeads® (Invitrogen) wurde Anti-HA Antikörper (Roche) gekoppelt und gecrosslinkt. Diese wurden mit Chloroplastenextrakten der cry3-HA Linie für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach 7-maligem Waschen erfolgte die Elution durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer (SDS) oder durch Inkubation mit Glycin-Puffer pH 2,5 (sauer) (dreimal 5 min) bzw. 10 min mit Thiethylamin-Puffer bei pH 11,8 (basisch). Nach dem pH-shift wurden die *beads* durch Aufkochen in SDS erneut eluiert (sauer+SDS bzw. basisch+SDS). 1/50 der Chloroplastenextrakte (Input) sowie 1/50 bzw. 1/5 der Eluate wurde im *Western blot* untersucht. Die Immunodetektion erfolgte mit anti-HA *high affinity* (Roche) und IRDye®800CW Goat anti-rat IgG (LI-COR BIOSCIENCES). Die Bande knapp über 55 kDa ist spezifisch für cry3-HA. In **b** wurden Chloroplastenextrakte der cry3-GFP Linie und der cry3 Mutante mit GFP-Trap® magnetic *beads* (ChromoTek) inkubiert. Von dem Input (In) wurde 1/10 geladen, sowie 1/20 der ungebundenen Proteine (UB). Die Elution mit saurem pH (E-S) erfolgte wie beschrieben und 1/2,75 wurde auf das Gel geladen. Die *Beads* wurden anschließend in SDS-Probenpuffer aufgekocht (E-SDS) und die Hälfte des Überstands untersucht. Das 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gel wurde mit Silber gefärbt, eingescannt und das Bild mit Image J in Graustufen umgewandelt. Das Fusionsprotein cry3-GFP hat ein Molekulargewicht von ca. 92 kDa.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass cry3-HA auch unter niedrigen pH-Werten noch an die *beads* assoziiert war. Nur wenig besser war das Resultat für die Elution mit einem hohen pH. Die basisch-eluierte Probe zeigt eine schwache Bande erwarteter Größe im *Western blot*, wobei das Laufverhalten im Gel negativ beeinflusst schien, die Spur war sehr breit und die detektierte Bande undeutlich. Möglicherweise wurde der pH nicht korrekt eingestellt, bevor die Probe auf das Gel geladen wurde. Der größte Teil von cry3 wurde auch hier erst durch das Aufkochen in SDS-Probenpuffer freigesetzt. Ein ähnliches Verhalten ist auch für die ColPs mit cry3-GFP zu beobachten, obwohl hier andere Antikörper und *beads* verwendet wurden. In Abbildung 3.16b ist ein silbergefärbtes Gel der entsprechenden Versuche gezeigt. Geladen wurden Input, ungebundene Proteine sowie die Eluate von IPs mit Chloroplasten der cry3-GFP Linie und der cry3 Mutante. Die *beads* wurden zunächst durch einen sauren pH (E-S) und anschließend durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer (E-SDS) eluiert. Die Gelspuren der ungebundenen Proteine zeigen klar definierte Banden und nur eine geringe Hintergrundfärbung, die nicht stärker ist als im Input. Während der Inkubation mit den *beads* scheint keine erhebliche Degradation der Proteine stattgefunden zu haben. Die Spuren der cry3-GFP Linie zeigen trotz gleicher relativer Lademenge insgesamt deutlich mehr Protein als die cry3 Mutante. Es wurden offensichtlich unterschiedliche Proteinmengen in die ColPs eingesetzt, obwohl dies durch eine Proteinmengenbestimmung vor der Inkubation vermieden werden sollte.

Cry3-GFP ist besonders gut in dem Eluat mit SDS-Probenpuffer als Bande bei etwa 100 kDa zu erkennen. In dem sauren Eluat ist auf dieser Höhe nur eine schwache Bande sichtbar. Auch zahlreiche andere Banden unterschiedlicher Größe scheinen erst durch das Aufkochen in SDS-Probenpuffer abgelöst worden zu sein. Einzig eine Bande bei etwa 55 kDa ist durch den pH-Shift effektiv eluiert worden und hauptsächlich in E-S sichtbar.

3.4.1.2 In den Eluaten der ColPs sind die affinitätsmarkierten Varianten von cry3 massenspektrometrisch nachweisbar

Die Elution der in der ColP gebundenen Proteine war effektiv nur mit SDS-Probenpuffer möglich. Für die Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern mittels ESI-TOF hat das zur Folge, dass die abgelösten Proteine nicht direkt verdaut und untersucht werden können. Das vorhandene Detergenz würde Trypsin ebenso wie andere Enzyme inaktivieren. Zur Lösung dieses Problems wurden für cry3-HA und cry3-GFP unterschiedliche Ansätze gewählt.

Die Eluate der ColPs gegen den GFP-tag zeigen im silbergefärbten Gel zahlreiche Banden, die im *Western blot* nicht durch den GFP-Antikörper erkannt werden (siehe Abbildung 3.16b,

Abbildung 3.17 c und d). Anders ist dies für ColPs mit Anti-HA. In Abbildung 3.17a ist eine Membran gezeigt, die nach dem *Western blot* mit *Deep purple™* gefärbt wurde. Die Sensitivität dieser Färbung ist mit Silber vergleichbar und in Abbildung 3.17b ist die Immunodetektion des HA-tags der gleichen Membran gezeigt. Untersucht wurden Proben aus einer ColP mit der cry3-HA Linie (+) bzw. der Mutante (-). Die *Deep purple™* Färbung macht nur in der Probe mit cry3-HA eine Bande sichtbar. Diese befindet sich knapp über der 55 kDa Bande des Markers und wird im *Western blot* durch anti-HA erkannt.

Des Weiteren wurde überprüft, ob cry3 durch die *beads* ohne Antikörper angereichert wird. Dafür wurden die Chloroplastenextrakte vor der eigentlichen ColP mit den *Dynabeads®* inkubiert, was auch als *preclean* bezeichnet wird. Proteine, die mit dem Trägermaterial und nicht den Antikörpern

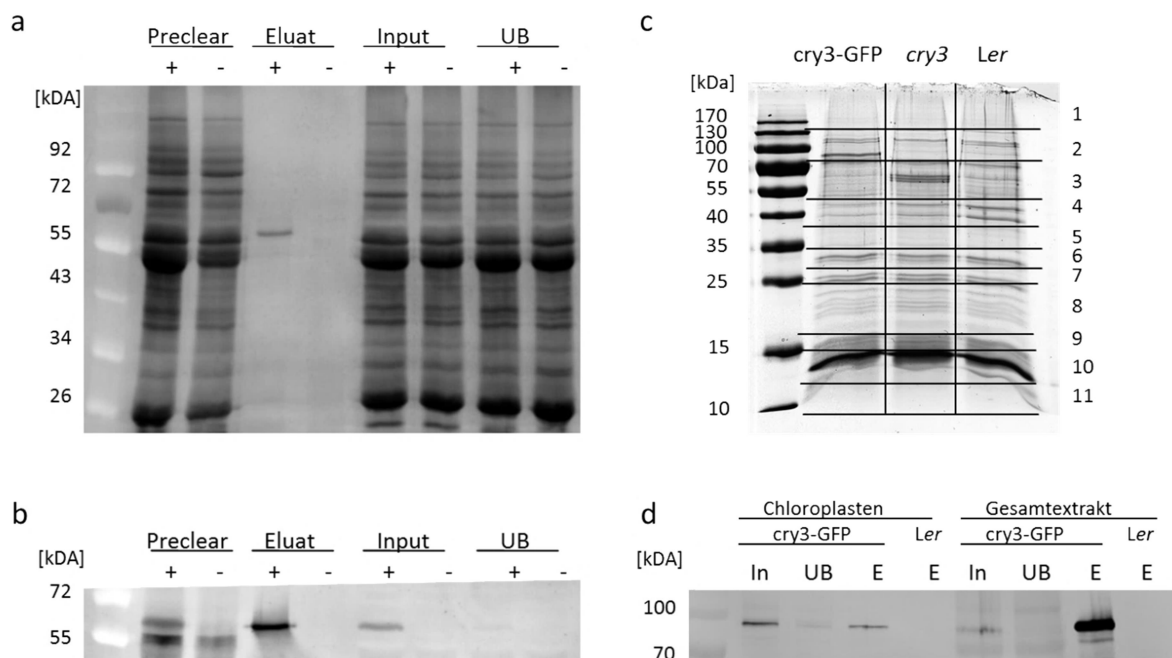


Abbildung 3.17. Cry3-GFP und cry3-HA können über ColPs deutlich angereichert werden.

In **a** und **b** wurden Protein G *Dynabeads®* (Invitrogen) verwendet, wobei die *beads* für die ColP mit Anti-HA Antikörper (Roche) gecrosslinkt war. Zunächst wurden jeweils 3 mg Chloroplastenextrakte (Input) adulter Pflanzen der cry3-HA-Linie (+) bzw. der cry3 Mutante (-) für 1 h bei 4°C mit den *beads* ohne Antikörper inkubiert (*Preclear*). Eine analoge Inkubation des Überstandes erfolgte anschließend mit Antikörpergekoppelten *beads* (ColP). Die ungebundenen Proteine (UB) wurden abgenommen, die *beads* gewaschen und durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer eluiert. Im *Western blot* auf PVDF Membran wurden 20 µg vom Input sowie UB eingesetzt. Die Eluate wurden komplett geladen. Die Membran wurde mit *Deep purple™* gefärbt und mit dem Typhoon® Scanner (GE Healthcare) visualisiert (**a**). (**b**) Die Immunodetektion erfolgte mit anti-HA *high affinity* (Roche), 800CW *goat anti-rat* (LI-COR BIOSCIENCES) und dem Odyssey® *imaging system* (LI-COR BIOSCIENCES). Die Bande knapp über 55 kDa ist spezifisch für cry3-HA. (**c**) Für die ColP (1 h bei 4°C) mit *GFP-Trap®_M* wurden Chloroplastenextrakte aus adulten Pflanzen der cry3-GFP Linie, der cry3 Mutante und des WT *Ler* verwendet. Die Eluate wurden komplett geladen und das 12,5%ige SDS-Polyacrylamid-Gel mit kolloidaalem Coomassie gefärbt. Zur weiteren Analyse mittels LC-ESI-MS wurde das Gel in die markierten Stücke zerteilt. (**d**) Der *Western blot* auf Nitrocellulose Membran wurde mit anti-GFP (Rockland) und IRDye® 800CW Donkey Anti-Goat IgG detektiert. Geladen wurde 1/20 des Inputs (In) und der ungebundenen Proteine (UB) sowie 1/6 der Eluate aus den ColPs (mit GFP-Trap, Inkubation 1 h bei 4°C) mit Chloroplasten- bzw. Gesamtextrakten aus adulten Pflanzen der cry3-GFP Linie und von WT *Ler*. Die Visualisierung erfolgte mit

Odyssey® Imaging System (LI-COR BIOSCIENCES) und die Bande knapp unter 100 kDa ist spezifisch für cry3-GFP.

interagieren, können so aus dem Ansatz entfernt werden. Der Überstand des *preclean* wurde später in die eigentliche CoIP eingesetzt, die zurückbehaltenen *beads* wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht und das so gewonnene Eluat mittels *Western blot* untersucht (*preclean*). Die Immundetektion zeigt ein spezifisches Signal für cry3-HA in der *preclean*-Spur (Abbildung 3.17b). Die Intensitäten des Signals in Input und *preclean* unterscheiden sich allerdings kaum. Ebenso sind die Bandenmuster in der *Deep purple™* Färbung für *preclean* und Input nahezu identisch (Abbildung 3.17a). Die Bindung an die *beads* ohne Antikörper scheint folglich nicht besonders spezifisch. In der Spur, in der die ungebundenen Proteine geladen wurden, ist im *Western blot* kein Signal für cry3-HA zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass alles verfügbare cry3 an die *beads* gekoppelt wurde.

Im Eluat der cry3-HA Linie kam es, wie zu erwarten, zu einer deutlichen Anreicherung des Zielproteins. Allerdings muss erwähnt werden, dass eine Quantifizierung zeigte, dass nicht das gesamte eingesetzte, markierte Protein im Eluat wieder gefunden wurde. Das Gleiche war auch für CoIPs mit cry3-GFP aus Chloroplastenextrakten zu beobachten (Abbildung 3.17d). In einem *Western blot* wurden 1/20 des Inputs und der ungebundenen Proteine sowie 1/6 des Eluats geladen. Bei einer kompletten Retention und Elution des vorhandenen Proteins wäre davon auszugehen, dass die Bande im Eluat deutlich intensiver ist als im Input. Tatsächlich zeigt sich das umgekehrte Ergebnis. Durch die geringe Proteinmenge, die noch in der Spur mit ungebundenem Protein zu erkennen ist, ist dies nicht zu erklären. Auch scheint das fehlende Protein nicht durch Waschen entfernt worden zu sein. Alle Waschfraktionen wurden gesammelt, präzipitiert und mittels *Western blot* untersucht. Es zeigte sich kein deutliches Signal für GFP oder HA (Daten nicht gezeigt). Das Verhältnis von Input zu Eluat konnte durch die Verwendung von *protein low binding tubes* (Eppendorf) etwas optimiert werden, jedoch nicht in dem Maße, dass eine Effizienz von annähernd 100% erreicht worden wäre. Überraschenderweise änderte sich dies, wenn statt Chloroplastenextrakten Gesamtextrakte in die CoIP eingesetzt wurden (siehe Abbildung 3.17d). Hier scheint nahezu das gesamte eingesetzte cry3-GFP auch wieder eluiert worden zu sein. Wird statt dessen ein Chloroplastenextrakt mit BSA versetzt, um die gleiche Proteinkonzentration wie im Gesamtextrakt zu erzielen, hat dies keinen Einfluss auf die Effizienz der Immunopräzipitation (Daten nicht gezeigt).

Ein großer Unterschied zwischen den CoIPs mit dem HA- bzw. GFP-Antikörper ist das Auftreten von Banden im Eluat, die nicht cry3 zuzuordnen sind. Wie bereits in 3.4.1.1 beschrieben, zeigte das Eluat der CoIP mit cry3-GFP zahlreiche zusätzliche Banden in der Silberfärbung und auch in einer Färbung

mit kolloidalem Coomassie (siehe Abbildung 3.17c). Anders ist dies bei Verwendung des HA-tags (siehe Abbildung 3.17a). Die *Deep purple™* Färbung zeigt ausschließlich eine Bande, die der Größe von cry3-HA entspricht und auch in der Immunodetektion von dem HA-Antikörper erkannt wird. Da folglich sehr wenige potentiell interagierende Proteine vorhanden sind, wurde das SDS aus den Eluaten der CoIP mit Anti-HA durch Waschen über einen Konzentrator (Vivaspin 500 *centrifugal concentrators* MWCO 10 kDA, Sigma-Aldrich) entfernt. Anschließend wurde die Probe mit Trypsin verdaut und mittels LC-ESI-MS untersucht.

Für die CoIP gegen GFP wurden die eluierten Proteine hingegen über eine SDS-Page aufgetrennt. Um kleine Fragmente nicht zu verlieren, wurde nicht gewartet bis die Lauffront das Gel verlassen hatte und die gesamte Spur untersucht (siehe Abbildung 3.17c). Das Gel wurde mit ESI-TOF kompatiblen Silber (nicht gezeigt) bzw. kolloidalem Coomassie gefärbt und jede Spur in 11 Fragmente unterteilt (Abbildung 3.17c). Die Gelstücke wurden ausgeschnitten, entfärbt, mit Trypsin verdaut und die enthaltenen Proteine mittels LC-ESI-TOF-MS untersucht.

3.4.1.3 Über LC-ESI-MS konnte kein potentieller Interaktionspartner eindeutig identifiziert werden

Die massenspektrometrische Untersuchung des Eluats aus den CoIPs mit Anti-HA zeigte insgesamt sehr wenige unterschiedliche Proteine zwischen der *cry3* Mutante und der *cry3*-HA Linie im *cry3* Mutantenhintergrund, wobei spezifisch nach Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* gesucht wurde. Kontaminationen von Proteinen aus anderen Spezies wurden bei der Auswertung vernachlässigt, da es sich dabei um Kontaminationen wie Keratin oder versuchsbedingte Komponenten wie Trypsin handelt. In den Eluaten von Proben, die *cry3*-HA exprimieren, wurde *cry3* massenspektrometrisch nachgewiesen. Insgesamt 17 spezifische Fragmente konnten *cry3* zugeordnet werden, die etwa 30% der gesamten Proteinsequenz abdecken. Die gefundenen Fragmente und deren Verteilung über das Protein sind im Anhang dargestellt (siehe Anhang Abbildung 6.6). Potentiell interagierende Proteine fanden sich kaum. Hauptsächlich konnten verschiedene ribosomale Proteine identifiziert werden. Allerdings war keines dieser Proteine spezifisch für die Proben der *cry3*-HA exprimierenden Linie, korrespondierende Fragmente konnten auch in der *cry3* Mutante gefunden werden.

Für die CoIPs mit *GFP-Trap®_M* wurde als Kontrolle neben der *cry3* Mutante auch der Wildtyp *Ler* untersucht, da dies der Hintergrund der *cry3*-GFP exprimierenden Linie ist. Insgesamt wurden drei unabhängige CoIPs durchgeführt und wie beschrieben analysiert. Wie bereits auf Grund der Proteinfärbungen zu erwarten war, konnten in den Extrakten der GFP-CoIPs wesentlich mehr unterschiedliche Proteine identifiziert werden, als bei Verwendung des HA-Antikörpers. Allerdings

waren nur sehr wenige dieser Proteine spezifisch für die cry3-GFP Linie. Die meisten identifizierten Proteine wurden aus allen *Arabidopsis*-Extrakten präzipitiert. In Tabelle 3.1 sind die LC-ESI-MS Treffer aufgeführt, welche nur bei Expression von cry3-GFP aufgetaucht sind. Mit Ausnahme von cry3, für welches zahlreiche Peptide gefunden wurden (siehe Abbildung 6.7), konnte den aufgeführten Proteinen nur ein oder zwei Peptide zugeordnet werden. Diese Peptide waren zudem immer nur in einer der drei durchgeführten CoIPs zu finden. Obwohl die markierten Varianten von cry3 gut präzipitiert werden konnten und nicht viel unspezifisch gebundenes Protein in den Eluat zu finden war, konnten weder mit dem HA- noch dem GFP-tag eindeutige Kandidaten für eine mögliche Interaktion gefunden werden.

Tabelle 3.2 Proteine, die in den CoIPs ausschließlich in Eluat der cry3-GFP Linie gefunden wurden.

Die CoIP-Eluate der cry3-GFP Linie, cry3 Mutante und von Ler wurden über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend Peptide mittels LC-ESI-MS bestimmt. Gezeigt sind die Peptide und korrespondierenden Proteine, die ausschließlich in Eluat der cry3-GFP Linie detektiert wurden.

Locus	Protein	Gefundene Peptide
AT1G62422.1	unknown protein	QLIHEIDAYEDSLEMK
AT1G48880.1	Protein trichome birefringence-like 7	VALETWASWIESTVDPNK
AT2G36160.1	40S ribosomal protein S14-1	TPGPGAQSALR
AT2G27710.1	60S acidic ribosomal protein P2-2	VVAAYLLAVLSGK DLAELIAAGR
AT1G07660.2	Histone H4	ISGLIYEETR IFLENVIR
AT5G64040.1	Photosystem I reaction center subunit N	AFTVQFGSCK LATSGANFAR
ATCG00840.1	50S ribosomal protein L23	HWVELFFGVK
ATCG45180	Lipid transfer protein	LGVCADLLGLVNVVVGSPPK
AT5G03350	Lectin-like protein	VTVTLPETVK

3.4.2 Yeast two hybrid library screen zur Identifikation von cry3 Interaktionspartnern

Eine andere Möglichkeit, potentielle Interaktionspartner von cry3 zu finden, ist der Y2H library screen. Das verwendete System basiert im Wesentlichen auf dem MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 von Clontech und wird dazu verwendet, Proteininteraktion in *Saccharomyces cerevisiae* aufzuspüren (Fields und Song, 1989). Cry3 wurde dafür als *bait* verwendet und als C-terminale Fusion im Plasmid pGBKT7 mit der Gal4 *DNA-binding* Domäne (BD) in Hefe exprimiert. Um einen Interaktionspartner zu identifizieren, werden diese Zellen mit einer cDNA *library* transformiert (CD4-10, von John Walker dem *Arabidopsis* Biological Resource Center zur Verfügung gestellt). Die verwendete *library* wurde mit mRNA hergestellt, die aus adulten *Arabidopsis* (Ökotyp Nossen) Blättern und Wurzeln isoliert und mit Randomprimern in cDNA umgeschrieben wurde. Diese cDNA wurde mit Adaptern versehen, *blunt-end* in die aufgefüllte XhoI Restriktionsschnittstelle des

Plasmids pACT ligiert und somit an den C-Terminus der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert (Durfee *et al.*, 1993).

3.4.2.1 Die Expression des BD-cry3 Fusionsproteins beeinflusst das Wachstum der Hefezellen nicht

Für die Identifikation eines möglichen Interaktionspartners von cry3 ist es zunächst entscheidend, dass dieses Protein auch in den Hefezellen exprimiert werden kann und auf diese nicht toxisch wirkt. Um dies zu überprüfen, wurden Proteingestamtextrikte aus Hefe hergestellt, die mit pGADT7 (AD) und pGBKT7 (BD) bzw. pGBKT7/CRY3 (BD-CRY3) transformiert wurden und folglich entweder die AD bzw. BD ohne Fusion oder mit cry3 exprimieren sollen. Um festzustellen, ob die transformierten Hefezellen Unterschiede in der Expressionsstärke von BD-cry3 zeigen, wurden jeweils drei Transformanten untersucht. Für die Detektion der in Abbildung 3.18 gezeigten *Western blots* wurden Anti-c-myc (A) und Anti-cry3 (B) Antikörper verwendet. Zwischen der 70 kDa und 100 kDa Bande des Markers ist mit beiden Antikörpern ein spezifisches Signal zu erkennen, welches auch zur erwarteten Größe des BD-CRY3 Fusionsproteins von etwa 82 kDa passt.

Die in Abbildung 3.18a und b gezeigten Proteinextrakte wurden aus dem Hefestamm Y190 hergestellt. In c wurde hingegen der Stamm AH109 verwendet und die Detektion erfolgte mit Anti-c-myc. Auch in diesem Hefestamm wird vollkommen analog zu Y190 ein Protein erwarteter Größe detektiert, so dass auch hier von einer guten Expression des Proteins ausgegangen werden kann. Um CRY3 als *bait* in einem *library screen* einsetzen zu können, ist es außerdem wichtig zu wissen, ob das Protein unter den für die Analyse verwendeten Bedingungen einen toxischen Einfluss auf die

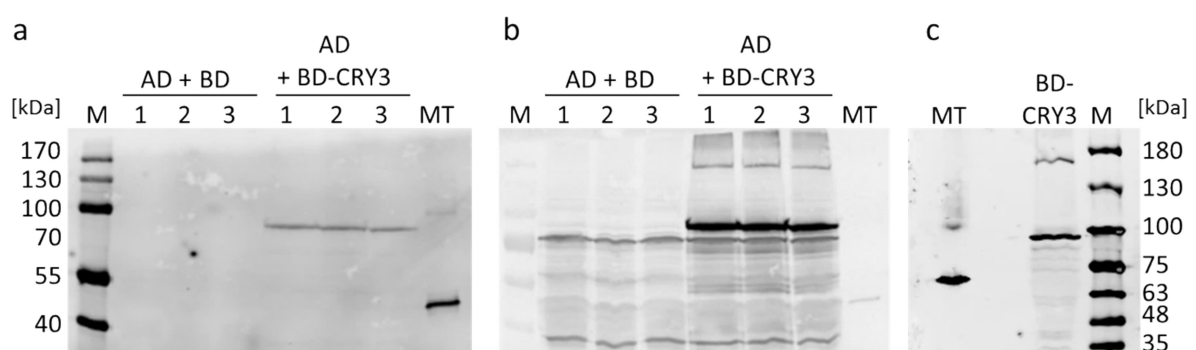


Abbildung 3.18. Western blots zeigen die Expression des cry3 Fusionsproteins in Hefe.

In a und b wurde der Hefestamm Y190 mit den Plasmiden pGADT7 (AD) und pGBKT7 (BD) bzw. pGBKT7/CRY3 (BD-CRY3) transformiert. Proteingestamtextrikte wurden aus jeweils drei Transformanten (1-3) hergestellt und jeweils 15 µg mittels *Western blot* auf Nitrocellulosemembran untersucht. In c wurde mit dem Stamm AH109 analog verfahren. Als Kontrolle wurden außerdem 20 ng eines *multiple tag proteins* (antibodies-online Inc.) sowie ein Proteingrößenmarker (M) aufgetragen. Die Immunodetektion erfolgte in a und c gegen den c-Myc-tag (anti-c-myc (9E10) (Covance) und IRDye® 680 Donkey anti-mouse (LI-COR BIOSCIENCES)) und in b gegen CRY3 (anti-cry3 SA4288 und IRDye® 800 Donkey anti-rabbit (LI-COR BIOSCIENCES)).

Hefezellen hat. Dies wurde überprüft, indem Hefezellen mit den Plasmiden pGADT7 und pGBKT7 (BD) bzw. pGBKT7/CRY3 transformiert und auf Minimalmedium (-LW) angezogen wurden. Um außerdem festzustellen, ob Blaulicht einen Einfluss auf das Hefewachstum hat, erfolgte die Anzucht entweder im Dunkeln oder unter $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Blaulicht. Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist, zeigt sich kein Unterschied in der Morphologie der Hefekolonien die BD-CRY3 oder nur die BD ohne Fusion, sowie die AD exprimieren. Auch das verwendete schwache Blaulicht zeigt keinen negativen Einfluss auf das Hefewachstum wie es für Licht stärkerer Intensitäten schon beobachtet werden konnte (Ułaszewski *et al.*, 1979).

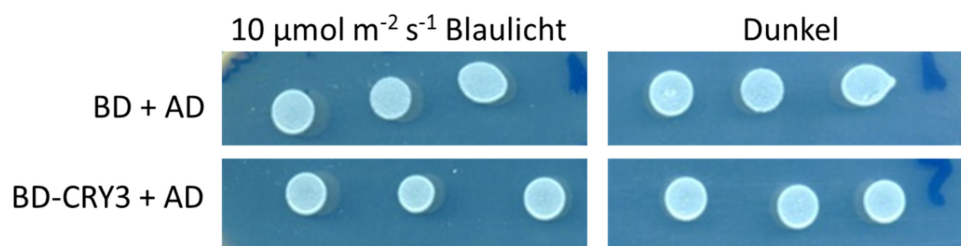


Abbildung 3.19. Die Expression von *cry3* beeinflusst das Hefewachstum nicht.

Der Hefestamm Y190 wurde mit den Plasmiden pGADT7 (AD) und pGBKT7 (BD) bzw. pGBKT7/CRY3 (BD-CRY3) transformiert. Jeweils drei Transformanten wurden in Minimalmedium ohne die Aminosäuren L und W über Nacht bei 30°C angezogen, bevor die gleiche Zelldichte auf Agarplatten mit identischem Medium getropft wurde. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30°C und entweder im Dunkeln oder unter $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Blaulicht inkubiert.

3.4.2.2 Im Y2H *library screen* wurden zwei potentielle Interaktionspartner von *cry3* identifiziert

Für den Y2H *screen* wurde der Hefestamm AH109, der mit dem Plasmid pGBKT7/CRY3 transformiert worden war, mit der cDNA *library* CD4-10 transformiert, die sich in dem Plasmid pACT befindet. Zwei unabhängige Transformationen wurden auf Minimalmedium ohne LWAH ausplattiert und zur Selektion auf Wachstum für insgesamt 10 Tage, bei 30°C im Dunkeln bzw. $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Blaulicht inkubiert. Die Zahl an transformierten Hefezellen wurde anhand des Wachstums auf Minimalmedium ohne L und W bestimmt und betrug im Dunkeln etwa 2×10^6 und im Blaulicht etwa 3×10^6 Zellen. Da die verwendete cDNA *library* eine Komplexität von $1,9 \times 10^6$ hat, kann davon ausgegangen werden, dass unter beiden Bedingungen ein großer Teil der *library* untersucht wurde.

In dem verwendeten Hefestamm AH109 werden *Ade2* und *His3* als Reportergene eingesetzt, deren Expression durch GAL4 reguliert wird. In Abbildung 3.20 wird deutlich, dass weder die Expression der AD und der BD, noch des Fusionsproteins BD-CRY3 in diesem Stamm zu einem Wachstum auf Medium ohne L, W, A und H führt. Auf Medium, das A und nur kein L, W oder L, W, H enthält, wachsen diese Hefezellen ohne Probleme. Fehlen alle vier Aminosäuren, dann sind nur die

Hefezellen gewachsen, die die Fusionsproteine BD-p53D und AD-SV40 als Positivkontrollen exprimieren. Für diese Proteine ist eine starke Interaktion bekannt (Iwabuchi *et al.*, 1993; Li und Fields, 1993) und entsprechende Plasmide wurden von Clontech als Positivkontrolle für Y2H *screens* empfohlen. Für den Y2H *library screen* bedeutet dies, dass ein Wachstum von Hefekolonien auf dem Selektionsmedium auf eine mögliche Interaktion von CRY3 mit dem Partnerprotein hindeuten kann oder, dass das Wachstum nur durch die Expression eines in der *library* kodierten Proteins ausgelöst wird.

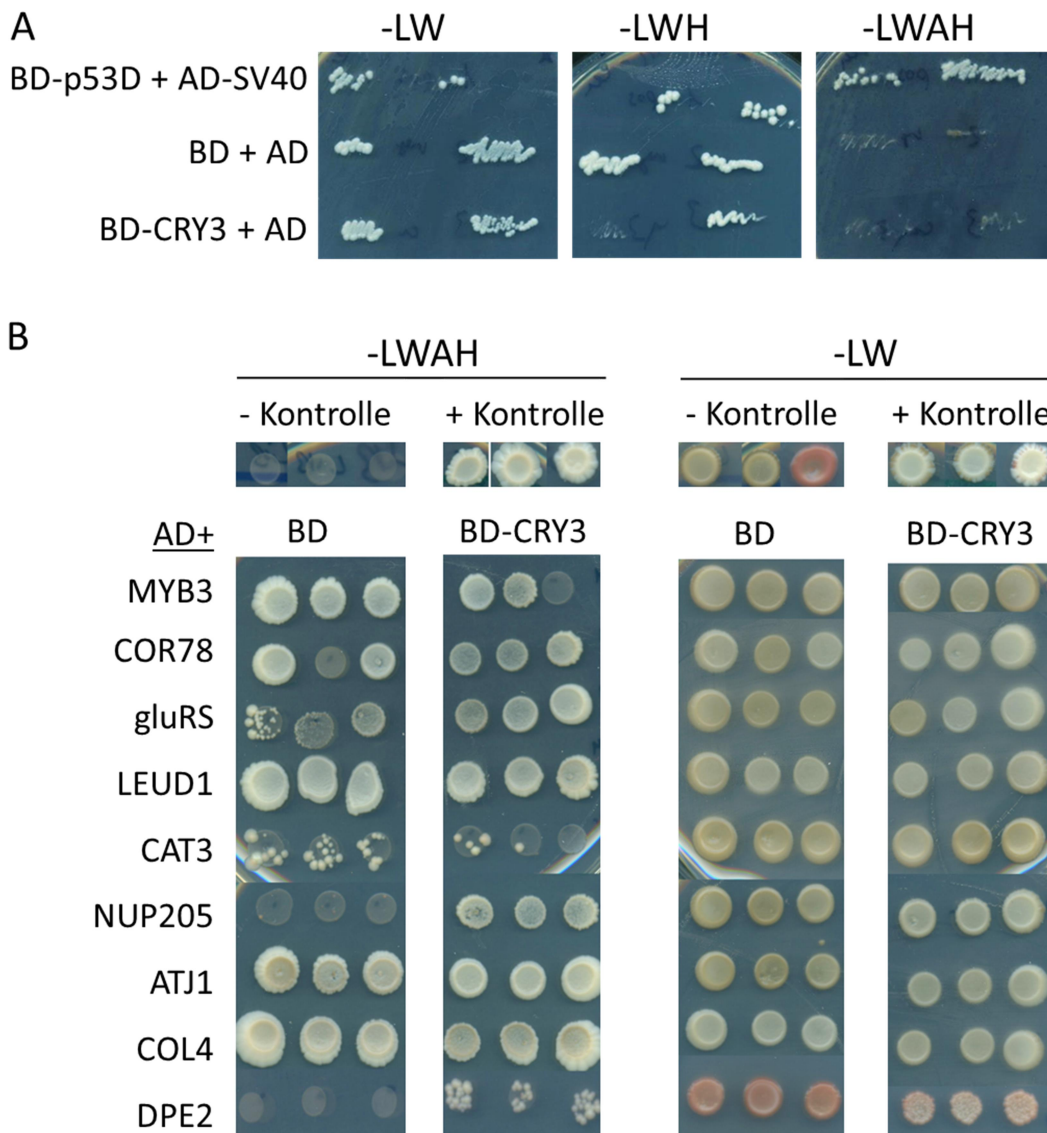


Abbildung 3.20 Hefewachstum auf unterschiedlichen Selektionsmedien.

Zur Kontrolle der Transformation des Hefestamms AH109 wurde Minimalmedium ohne L und W verwendet (-LW). Zur Selektion auf eine Interaktion der Fusionsproteine wurde zusätzlich H (-LWH) bzw. H und A (-LWAH) ausgelassen. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 30°C für 1 Woche. In **a** wurde Hefe verwendet, die die Plasmide pGADT7 (AD) und pGBKT7 (BD) bzw. diese Plasmide mit den Inserts p53D, SV40 und CRY3 trägt und somit die angegebenen Fusionsproteine exprimiert. In **b** wurde als + Kontrolle pGBKT7/p53D und pGADT7/SV40 und als - Kontrolle pGBKT7/CRY3 und pGADT7 verwendet. Hefe, die pGBKT7 (BD) bzw. pGBKT7/CRY3 (BD-CRY3) enthält, wurde mit den Plasmiden transformiert die im *library screen* zu einem Koloniewachstum auf Selektionsplatten-LWAH geführt haben. Bei den Plasmiden handelt es sich um pACT mit den angegebenen Inserts, die als Fusion mit der AD exprimiert werden.

Kam es zu einem Wachstum von Hefekolonien auf dem Selektionsmedium -LWAH, so wurden diese Kolonien zunächst weiter vereinzelt, um schließlich Klone zu selektionieren, die pGBKT7/CRY3 und ein einzelnes *library* Plasmid enthalten. Um zu überprüfen, ob dies der Fall war oder mehrere unterschiedliche Plasmide in den Hefezellen anwesend waren, wurden die Inserts in pACT mittels Kolonie-PCR mit den Primern pACT2 FW und RW amplifiziert und die Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. War nur eine Bande sichtbar, wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und sequenziert. Zeigten sich mehrere Banden, wurde das *library* Plasmid, das das Wachstum ausgelöst hat, zunächst durch weitere Vereinzlungsausstriche auf Selektionsmedium-LWAH segregiert.

Tauchte ein Insert einer spezifischen Größe in mehreren Kolonien auf, wurde das PCR-Produkt zunächst mit MspI (einem häufig schneidenden Restriktionsenzym) verdaut und das Schnittmuster auf Agarosegelen überprüft. Zeigte sich auch hier ein identisches Restriktionsmuster, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um das gleiche Insert handelt. Eine stichprobenartige Überprüfung dieser Annahme wurde durch eine Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt. In Tabelle 3.3. sind alle unterschiedlichen Inserts aufgeführt, die so identifiziert wurden. Über einen Nukleotid BLAST (NCBI) konnten den DNA-Sequenzen Gene zugeordnet werden. Besonders das Insert MYB3 wurde in sehr vielen Hefekolonien gefunden.

Tabelle 3.3. Inserts der Klone die im Y2H Screen auf Selektionsmedium wachsen.

Die Inserts in dem *library* Plasmid pACT wurden mit den Primern pACT2 FW und RW amplifiziert und die Größe der Amplifikate über Agarosegelelektrophorese abgeschätzt. Die PCR Produkte wurden Sequenziert und die entsprechenden Gene über den NCBI *standard nucleotide* BLAST identifiziert. Die Abkürzungen und die Lokalisation sind TAIR entnommen (Lamesch *et al.*, 2012).

Abkürzung	Gen	Klone im Dunkeln/Blau	Richtige Translation	Insert Größe [kbp]	Lokalisation	Name
MYB3	At1G22640	15/4	Ja	1.2	Kern	MYB-type transcription facto
COR78	At5G52310	3/1	Nein	1.5	-	Cold Regulated78
gluRS	At5G26710	4/2	Ja	1	Cytoplasma	Glutamyl/glutaminyl-tRNA synthetase
LEUD1	At2G43100	1/1	Ja	0.8	Chloroplast	Isopropylmalate Isomerase 2
CAT3	At1G20620	1/0	Ja	1	Zahlreiche Kompartimente	Catalase3
NUP205	At5G51200	0/1	Ja	1.6	Kern, Chloroplast	Nuclear pore complex protein NUP205
ATJ1	At1G28210	0/2	Ja	0.6	Mitochondrium	Chaperone protein dnaJ 1
Col4	At5G24930	0/1	Ja	0.4	Kern	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 4
DPE2	At2G40840	0/2	Ja	1.6	Cytoplasma, Chloroplast	4-alpha-glucano-transferase DPE2

Im Dunkeln enthielten 15 der 24 gefundenen Kolonien dieses Insert während andere Gene selten und zum Teil nur einmal entdeckt wurden. Im Blaulicht zeigten insgesamt nur 14 Kolonien ein Wachstum auf dem Selektionsmedium. Wichtig war es auch zu überprüfen, ob sich die DNA-Sequenzen im richtigen *open reading frame* befinden, da es sonst zu keiner korrekten Translation des entsprechenden Proteins kommt. Tatsächlich befanden sich fast alle gefundenen cDNA-Inserts im richtigen Leseraster, nur für COR78 war dies nicht der Fall. Hier war die cDNA falsch herum in das *library* Plasmid inseriert. Das daraufhin gebildete Peptid zeigte in einem Protein BLAST (NCBI) keine nennenswerte Ähnlichkeit zu einem bekannten Protein aus *Arabidopsis*.

Um weitere Anhaltspunkte dafür zu finden, dass die identifizierten Proteinfragmente mit cry3 interagieren, sollte überprüft werden, ob tatsächlich die Anwesenheit beider Plasmide in den Hefezellen für ein Wachstum auf Selektionsmedium notwendig ist. Genügt die Anwesenheit von entweder dem AD- oder BD-Plasmid mit entsprechender Fusion, so wird von einer Selbstaktivierung gesprochen. Daher wurde zunächst die Plasmid-DNA aus den Hefezellen isoliert und diese direkt in kompetente *E.coli* transformiert. In den Bakterienzellen konnte wiederum mit Hilfe der Ampicillin Resistenz auf das *library* Plasmid selektioniert und somit gezielt nur diese DNA aufgereinigt werden. Der Hefestamm AH109 wurden daraufhin mit den neun verschiedenen, isolierten *library* Plasmiden und entweder pGBKT7 oder pGBKT7/CRY3 transformiert und das Verhalten auf Medium ohne LWAH bzw. LW beobachtet. Das spezifische Wachstum von jeweils drei unterschiedlichen Transformanten ist in Abbildung 3.20b dargestellt. Alle Hefekolonien wachsen auf Medium ohne L und W, was anzeigt, dass sowohl das AD- als auch BD-Plasmid exprimiert wird, die Transformation also erfolgreich war und die Plasmide keinen toxischen Effekt haben.

Interessanter ist jedoch das Verhalten auf den Selektionsplatten ohne LWA und H. Hier wird deutlich, dass eine Vielzahl der *library* Plasmide in Kombination mit dem BD-Plasmid ohne CRY3 ebenso gut wachsen wie mit BD-CRY3. Besonders deutlich wird dies für MYB3, COR78, LEUD1, ATJ1 und COL4. Alle Hefezellen, die diese Inserts tragen, zeigen ein sehr gutes Wachstum auf Selektionsmedium, welches komplett unabhängig von CRY3 ist. CAT3 führte insgesamt nur zu einem schwachen Wachstum, dieses erscheint jedoch ohne die Anwesenheit von CRY3 noch besser zu sein. Nicht ganz klar ist das Verhalten für gluRS. Wird es mit dem BD Vektor exprimiert, zeigt sich zwar ein schwaches aber doch sichtbares Wachstum der Hefekolonien. Durch die Anwesenheit von BD-CRY3 wird dieses Wachstum stärker. Klarer ist der Fall für NUP205 und DPE2. Ein Wachstum auf Selektionsmedium (-LWAH) ist hier für alle transformierten Hefekolonien nur möglich, wenn BD-CRY3 ebenfalls exprimiert wird.

4 Diskussion

4.1 Die *in planta* Cofaktoren von cry3

Damit ein Protein als Photorezeptor fungieren kann, muss es in der Lage sein Licht wahrzunehmen. Diese Eigenschaft ergibt sich über spezielle Aminosäuresequenzen bzw. Strukturen innerhalb des Proteins oder über Cofaktoren die kovalent oder nicht kovalent an das Apoproteine gebunden werden und die Absorptionseigenschaften maßgeblich bestimmen. Die spektroskopischen Eigenschaften, die Identität und die Bindung von Cofaktoren an das DASH Cryptochrom aus *A. thaliana* wurden ausführlich untersucht (Moldt *et al.*, 2009; Pokorny *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2006). Diese Daten basieren allerdings auf heterolog exprimiertem Protein. In wieweit das Expressionssystem einen Einfluss auf die Identität bzw. die gebundenen Cofaktoren des Holoproteins hat ist nicht eindeutig vorher zu sagen. Durch den hier gezeigten Ansatz war es möglich die Cofaktoren, die mit pflanzenexprimiertem cry3 assoziiert sind, fluorimetrisch zu charakterisieren.

4.1.1 Die an pflanzenexprimiertem cry3-GFP gebundenen Cofaktoren können fluorimetrisch charakterisiert werden

Für die Cofaktorbestimmung wurde eine Fusion von cry3 mit GFP verwendet. Das grünfluoreszierende Protein hat dabei keinen Einfluss auf die fluorimetrischen Messungen, wie auch vorangegangene Studien mit Phot1-GFP zeigten (Sullivan *et al.*, 2008). Die Fluoreszenz von GFP kommt nicht durch die Bindung eines externen Chromophors zustande, sondern vielmehr durch die spezielle Faltung des Proteins. Aminosäurereste (Ser65–Tyr66–Gly67) von GFP bilden den Chromophor 4-(p-hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-one (HBI). Freies HBI ist ohne den Proteinanteil nicht fluoreszent (Craggs, 2009). Die Freisetzung der potenziell an cry3 gebundenen Cofaktoren erfolgte unter stark sauren Bedingungen, die Proteine vollständig denaturieren und somit auch das GFP.

Zur Präzipitation von cry3-GFP wurde *GFP-Trap®_M* (Chromotek) verwendet. Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern mit schweren und leichten Ketten kommen in *Camelidae* so genannte *heavy chain* Antikörper vor, wie sie in *GFP-Trap®_M* verwendet werden. Das Antigen wird in diesen Antikörpern über eine einzelne variable Domäne (V_HH) gebunden, welche sehr spezifisch ist und hier an die *beads* gebunden verwendet wurde (siehe auch 2.4.9.3). Zur Detektion von GFP in *Western blots* wurde ein konventioneller IgG Antikörper (Anti-GFP Rockland) verwendet. Zusätzlich zu dem Signal, welches für die cry3-GFP exprimierenden Pflanzen spezifisch ist und der erwarteten

Größe des cry3-GFP Fusionsprotein von etwa 95 kDa entspricht, sticht neben einigen schwächeren Banden besonders eine sehr deutliche Bande bei etwa 50 kDa heraus (siehe Abbildung 3.1). Ob es sich dabei um ein sehr abundantes Protein oder sogar mehrere handelt, die vom primären oder sekundären Antikörper erkannt werden, bleibt offen. Diese Bande taucht nicht in den Eluaten der Immunopräzipitation auf, anti-GFP V_HH bindet dieses Protein bzw. diese Proteine folglich nicht. Für die Interpretation der Ergebnisse sind sie somit nicht von Bedeutung.

Die an die *beads* gebundenen Proteine wurden mit 7 % TCA Puffer denaturiert und der Überstand zur fluorimetrischen Untersuchung abgenommen. Die an die *beads* assoziierten Proteine wurden schließlich durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer eluiert. In der löslichen Fraktion (ET), die später fluorimetrisch untersucht wurde und die Cofaktoren enthält, ist im *Western blot* kein GFP detektierbar (siehe Abbildung 3.1. b). Die denaturierten Proteine wurden somit effektiv über eine Zentrifugation pelletiert. Ein Einfluss von GFP auf die detektierten Signale kann auch aus diesem Grund ausgeschlossen werden

Als Kontrolle wurden die GFP-Trap® *magnetic beads* nicht nur mit Extrakten der cry3-GFP exprimierenden Pflanzen, sondern auch mit denen einer *cry3*-Mutante inkubiert und parallel prozessiert. In den Eluaten dieser Kontrolle konnte unter den getesteten Bedingungen keinerlei Fluoreszenz detektiert werden, die oberhalb der Leer-Kontrolle lag (Abbildung 3.2 b, d). Bei der Leer-Kontrolle handelt es sich um ein leeres Reaktionsgefäß welches ebenfalls mit TCA-Puffer inkubiert und zentrifugiert wurde (siehe 2.4.8.1), der Überstand wurde zur Messung der Baseline eingesetzt. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass die Puffer für Baseline und Messung die gleiche Zusammensetzung haben und sich nicht in Bezug auf Abbau oder Zerfallsprodukte unterscheiden, die während der Inkubation entstehen können. Tatsächlich zeigten die Spektren der *cry3* Mutante negative Werte nachdem die Baseline abgezogen wurde. Möglicherweise haben einzelne Pufferbestandteile mit den GFP-Trap® *magnetic beads* oder mit Rückständen der Pflanzenextrakte reagiert. Da diese Messmethode sehr sensitiv ist und sein muss, ist sie auch sehr anfällig für mögliche Störungen.

Die Menge an Protein, die mit der verwendeten Methode aus *A. thaliana* angereichert werden kann, ist gering. Insgesamt konnten etwa 18 pmol cry3-GFP aus *A. thaliana* Extrakten präzipitiert werden. Für die Absorptionsspektroskopie reicht die so erhaltene Konzentration von 180 nM nicht aus, weshalb die Charakterisierung alleine über die Fluoreszenzeigenschaften erfolgte.

Bei der Interpretation der Spektren kann wie oben dargelegt, sicher davon ausgegangen werden, dass die Signale auf die cry3-GFP Probe zurück zu führen sind. Nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann jedoch, ob die Überexpression des Fusionsproteins einen deutlichen Einfluss auf das pflanzliche Proteom hat. Neben der GFP Fusion werden auch weitgehend unspezifisch Proteine an

die *beads* gebunden (vergleiche hierzu Abbildung 3.16). Ein verändertes Proteom könnte dazu führen, dass ein entsprechendes Protein in der Kontrolle (Extrakte der *cry3* Mutante) nicht oder unterhalb des Detektionslimits auftaucht was in der Probe (Extrakt der *cry3*-GFP Linie) zu einem Fluoreszenzsignal führt. Gegen einen störenden Effekt durch die *cry3*-GFP Überexpression spricht die Untersuchung des Chloroplastenproteoms (siehe 3.3.2) und das allgemeine Fehlen eines sehr deutlichen Phänotyps für die *cry3* Mutante und die *cry3* Überexpressionslinie in *A. thaliana*. Allerdings muss erwähnt werden, dass die genaue Stärke der Überexpressionslinie auf Proteinebene nicht überprüft wurde, die verfügbaren Antikörper gegen *cry3* sind in Pflanzenextrakten nicht besonders spezifisch. Während die Überexpression des Cryptochroms keinen Einfluss auf das Chloroplastenproteom zeigte, war für die Deletion von *cry3* zwar ein Unterschied zu detektieren, dieser belief sich jedoch bei einzelnen Proteinen maximal auf einen Faktor von etwa 2,5 (siehe 3.3.2).

Ein weiterer Kritikpunkt am gewählten Ansatz könnte sein, dass ein Protein, welches direkt oder indirekt mit *cry3*-GFP interagiert kopräzipitiert würde. Mögliche Cofaktoren des interagierenden Proteins würden ebenso wie die von *cry3* detektiert werden. Eine Immunopräzipitation, die mit der zur Cofaktoranalyse vergleichbar ist, wurde in 3.4.1 mit Chloroplastenextrakten durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden über eine SDS-PAGE gereinigt, aufgetrennt und die komplette Spur massenspektroskopisch untersucht. Es war nicht möglich auf diese Weise einen spezifischen Interaktionspartner von *cry3* zu identifizieren. Daher spricht alles dafür, dass die aufgenommenen Fluoreszenzsignale durch Cofaktoren zustande kamen, die an *cry3*-GFP gebunden waren und werden im Folgenden auch als solche bezeichnet.

4.1.2 MethylenTHF scheint *in planta* nicht von *cry3* gebunden zu werden

Als Referenz wurden die Cofaktoren von *E. coli* exprimiertem *cry3*-His-tag in vergleichbarer Konzentration untersucht. Weder für *cry3*-His-tag noch für *cry3*-GFP konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass MethylenTHF vorhanden war. Bei entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen konnte keinerlei Fluoreszenz oberhalb der *baseline* detektiert werden. MethylenTHF ist die reduzierte Form von MethenylTHF. Durch 200 mM β -Mercaptoethanol im Elutionspuffer wurde diese Form stabilisiert, da MethenylTHF unter sauren Bedingungen schnell zu THF und Formaldehyd zerfällt. Moldt *et al.* konnten 2009 zeigen, dass in *E. coli* exprimiertem *cry3* ebenso wie in der *E. coli* Photolyase die reduzierte Form von MethylenTHF gebildet wird, wenn das Protein mit UV-A belichtet wird (Moldt *et al.*, 2009). Dieser Prozess wird auch als *photobleaching* bezeichnet und benötigt sowohl Licht als auch eine intakte Tryptophantriade, weshalb davon ausgegangen wird, dass ein Elektron von FADH^* auf das Folat übertragen wird. Dabei handelt es

sich um einen alternativen Elektronentransportweg neben der Übertragung eines Elektrons auf den CPD Schaden. Moldt *et al.* spekulierten, ob dieser Weg möglicherweise Teil einer Funktion des DASH-Cryptochroms sein könnte, über den es Einfluss auf den Folatstoffwechsel in den Pflanzenzellen nimmt. Die Bildung von MethylenTHF ist über mehrere Stoffwechselwege möglich. Sollte dies die Hauptfunktion von cry3 sein, muss dessen Deletion nicht zwangsweise einen deutlichen Phänotyp zeigen, da der Ausfall zumindest teilweise kompensiert werden könnte. *In vitro* war die Reduktion von MethenylTHF von einer starken Belichtung mit UV-A abhängig. Das hier verwendete Pflanzenmaterial wuchs hingegen in Anzuchtkammern, die weitgehend frei von UV-Licht sind. Dass kein MethylenTHF gefunden wurde, könnte also mit der fehlenden UV-Belichtung zusammenhängen. Mit dem gegebenen Versuchsansatz kann in Zukunft untersucht werden, ob und unter welchen Lichtbedingungen die Reduktion des Folats *in planta* stattfindet. Das Ergebnis des *in planta* Ansatzes wäre für eine Klärung der biologische Funktion wesentlich aufschlussreicher als die *in vitro* Analyse, doch besteht hier das höhere Risiko die wenig stabile Form des Folats zu verlieren.

4.1.3 MethenylTHF und FAD sind die *in planta* Cofaktoren von cry3

Die eluierten Cofaktoren von cry3-GFP und cry3-His-tag zeigten deutliche Signale, die mit den Fluoreszenz-Eigenschaften von MethenylTHF überlappen. Die genauen Maxima zeigen im Vergleich zum Standard (käuflich erworbenes MethenylTHF) eine Verschiebung zur längeren Wellenlänge (bathochrome Verschiebung) im Excitations und Emissionsspektrum (siehe Abbildung 3.2 a und b). Weiterhin zeigen die Emissionsspektren eine deutliche Schulter oberhalb von 475 nm, die sowohl für von cry3-His-tag als auch von cry3-GFP eluierten Cofaktoren auftritt. In den Excitationsspektren aller Proben zeigt sich im Bereich von etwa 275 nm ein zusätzliches Maximum. Vergleicht man diese Fluoreszenzspektren mit denen für die eluierten Cofaktoren, die über eine HPLC aufgetrennt wurden, fällt auf, dass der zusätzliche Peak, sowie die Schulter verschwunden sind (siehe Abbildung 3.3 d). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei entweder um andere fluoreszierenden Moleküle handelt, oder der Effekt durch die unterschiedlichen Puffer zustande kommt, in denen sich die HPLC-Eluat befinden.

Die Flavin-Standards haben eine maximale Emission von etwa 520 nm bei Anregung mit 450 nm. Dieser Peak ist nahezu identisch für die Standards sowie die eluierten Cofaktoren von cry3-His-tag und cry3-GFP. Das korrespondierende Excitationsspektrum zeigt zwei Maxima. Das Maximum im blauen Bereich ist in Lage und Struktur nahezu identisch für Standards und eluierte Cofaktoren. Der Peak im UV-A-Bereich ist für cry3-His-tag und cry3-GFP hingegen leicht zur kürzeren Wellenlänge hin verschoben (hypsochrom). Wesentlich auffälliger ist allerdings, dass der UV-A-Peak für die eluierten Cofaktoren deutlich größer ist als der Blau-Peak. Bei den eluierten Cofaktoren werden die

Flavine nicht isoliert gemessen, es handelt sich um eine Mischung verschiedener Cofaktoren, die auch Folate enthält. Wie in den Abbildung 3.2 c und d ersichtlich, führt die Anregung mit 350 nm zu einer deutlichen Fluoreszenz auch im Bereich von 520 nm. Vermutlich wird dieser UV-Peak im Anregungsspektrum durch ein Folat ausgelöst, wofür auch das weiter unten erläuterte Verhalten in der HPLC spricht. Auch wenn das Emissionsmaximum von MethenylTHF bei 460 nm liegt, emittiert es immer noch deutlich im Bereich von 520 nm (siehe Abbildung 3.2). Im Emissionsspektrum für Flavin ist dies nicht von Bedeutung, mit 450 nm wird einzig das Flavin und kein Folat angeregt. Bei einem pH-Wert von 2,5 und 7,5 verschwand sowohl die hypsochrome Verschiebung als auch das Missverhältnis der beiden Peaks im Exitationsspektrum zu einander. Zur Einstellung des pH-Werts wurden die Eluate zunächst neutralisiert. MethenylTHF ist sehr instabil im Neutralen und Basischen (De Brouwer *et al.*, 2007b). Die Zugabe von 5 M NaOH kann zu einer schnellen und irreversiblen Umwandlung von MethenylTHF zu einem Folat geführt haben, das nicht bei 520 nm emittiert, zum Beispiel N5-formyltetrahydrofolate (Quinlivan, Hanson und Gregory, 2006; De Brouwer *et al.*, 2007a).

Die Fluoreszenzintensität des von cry3-GFP eluierten Flavins zeigte eine deutliche pH-Abhängigkeit und war bei pH 2,5 mehr als doppelt so hoch wie im Neutralen. Diese pH-Abhängigkeit ist ein deutliches Indiz dafür, dass zumindest hauptsächlich FAD an cry3-GFP gebunden vorlag. Im Gegensatz zu FMN und Riboflavin zeigt nur FAD diese charakteristische pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität (Islam *et al.*, 2003).

Die Auftrennung der eluierten Cofaktoren von cry3-GFP und cry3-His-tag über HPLC bekräftigt die Schlussfolgerung, dass beide Proteine die gleichen Cofaktoren gebunden hatten. Das Elutionsverhalten in der HPLC war für die Flavine aus cry3-GFP und cry3-His-tag nahezu identisch. Im Vergleich zu den Standards zeigte sich allerdings eine geringe Verschiebung der Peaks (siehe Abbildung 3.3). Das Maximum an Flavin aus cry3 ist etwa 0,1 ml vor dem Standard-Flavin zu finden und ein zweites, kleineres Maximum zeigt sich 0,1 ml vor dem FMN-Standard. Auch wenn sich hier mehrere Peaks zeigten, muss nicht unbedingt davon ausgegangen werden, dass cry3 unterschiedliche Flavine bindet. Es kann sich dabei auch um Abbauprodukte und Modifikationen von FAD handeln. Für das *E. coli* exprimierte cry3-His-tag konnten die Cofaktoren MethenylTHF und FAD mit unterschiedlichen Methoden als Cofaktoren nachgewiesen werden (Chaves *et al.*, 2011; Klar *et al.*, 2007; Moldt *et al.*, 2009).

Betrachtet man die zugehörigen Fluoreszenzspektren, so zeigt sich im zweiten Maximum eine beinahe vollkommene Überlagerung der Kurvenverläufe der Cofaktoren mit nur minimalen Unterschieden zum Standard. Im ersten Maximum zeigte das cry3-GFP-Spektrum jedoch eine deutlich erhöhte Anregung im UV-Bereich (ca. 360 nm). Möglicherweise eluiert hier ein weiteres

Folat, welches eine deutliche Emission bei 520 nm aufweist, wenn es mit UV-Licht angeregt wird. Die zu MethenylTHF passende Emission bei 460 nm (ex350) findet sich im Falle von cry3-His-tag hauptsächlich in einer einzigen Fraktion der HPLC, in cry3-GFP hingegen auf drei Fraktionen verteilt. Im Vergleich zum Standard waren die Maxima etwas verschoben. Dieses abweichende Elutionsverhalten lässt sich durch die Polyglutamierung von MethenylTHF erklären, die bereits für die Cofaktoren von *E.coli* exprimiertem cry3-His-tag gezeigt wurde (Moldt *et al.*, 2009). Naheliegender wäre daher, dass in der pflanzenexprimierten Probe unterschiedlich lange Polyglutamat-Schwänze an MethenylTHF fusioniert waren und somit das abweichende Elutionsverhalten und den breiteren Peak bedingten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass pflanzenexprimiertes cry3-GFP ebenfalls MethenylTHF und FAD als Cofaktoren bindet. Die Verwendung des *E. coli* exprimierten Proteins erscheint somit als geeignetes System, um das Verhalten des DASH-Cryptochroms zu studieren. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass in dem pflanzenexprimierten Protein eine weitere Spezies Folat zu finden war, doch ist es möglich, dass es sich dabei um Abbauprodukte von MethenylTHF handelt, die während der Prozessierung der Probe entstanden sind (Tyagi *et al.*, 2009; De Brouwer *et al.*, 2007a).

Diese Daten sprechen dafür, dass die *in vitro*, mit dem heterolog exprimierten Protein gewonnenen Ergebnisse, auch für die *in planta* Analysen valide sind. Auch stützt es die Ergebnisse für andere heterolog exprimierten Proteine der Cryptochrom/Photolyase Familie, am häufigsten wurden dabei ebenfalls FAD und MTHF als Cofaktoren gefunden (Schelvis und Gindt, 2017). Auch für die pilzlichen DASH-Cryptochrome aus *Phycomyces blakesleeana*, *Fusarium fujikuroi* und *Neurospora crassa* (Tagua *et al.*, 2015; Castrillo und Avalos, 2015; Froehlich *et al.*, 2010), sowie für OtCPF2 (DASH-Cryptochrom) aus der Grünalge *Osteococcus tauri* (Heijde *et al.*, 2010) wurden FAD und MethenylTHF als Cofaktoren identifiziert. Für das Bakterium *Vibrio cholerae* wird ebenfalls davon ausgegangen, dass MethenylTHF von dem DASH-Cryptochrom gebunden wird (Worthington *et al.*, 2003a). Anders für das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803, MethenylTHF scheint hier kein Cofaktor von Syn-CRY zu sein (Brudler *et al.*, 2003; Hitomi *et al.*, 2000), hingegen gibt es Hinweise auf die Bindung von Cyanopterin (Moon *et al.*, 2010). Bei FAD und MethenylTHF scheint es sich dennoch, um die vorherrschenden Cofaktoren in der Klasse der DASH-Cryptochrome zu handeln, der Zusammenhang mit einer biologischen Funktion ist bisher offen.

4.2 Lokalisation und Expression von cry3

Zur weiteren *in planta* Charakterisierung von cry3 wurden Fusionen mit HA und c-Myc kloniert. In Tabak konnte nach transienter Expression kein cry3-c-Myc detektiert werden. Die korrekte Klonierung des entsprechenden Plasmids wurde durch Sequenzierung überprüft und wies keine Fehler auf. Der verwendete Plasmid pFGC5941 unterscheidet sich nur in den für den Myc-tag kodierenden Sequenzen von dem zur Transformation von cry3-HA verwendeten. Ein negativer Einfluss dieser wenigen Nukleotide auf die Transformation durch Agrobakterien erscheint unwahrscheinlich. Während die verwendeten Antikörper gegen den Myc-tag in anderen Extrakten beispielsweise aus Hefe sehr gut funktionieren, war das Ergebnis eines *Western blots* mit Pflanzenextrakten unspezifisch. Es sind zahlreiche unterschiedlich starke, unspezifische Banden zu detektieren, möglicherweise führt dies zu einer Maskierung des eigentlichen Signals für cry3-c-Myc. Sowohl für CoIPs als auch für Lokalisationsstudien ist eine spezifische Antikörper-Antigen Interaktion essenziell. Da dies für den Myc-tag nicht gegeben zu sein schien, wurden keine *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit dem c-Myc Konstrukt transformiert.

Die Transformation von unterschiedlichen *A. thaliana* Ökotypen resultierte in einer großen Anzahl BASTA-resistenter Pflanzen (etwa 50 bis 100). Obwohl dies dafür spricht, dass die Transformationsrate in allen Ökotypen sowie der Mutante gut war, zeigte die Untersuchung der Expression mittels *Western blot* eine deutliche Variabilität. Ein Einfluss der Ökotypen auf die Transformationseffizienz durch *floral dip* wurde zwar auch von anderen dokumentiert, doch scheint sich dies hier nicht zu bestätigen, da hierbei ein Einfluss des Blütenstandes und speziell des unterschiedlich entwickelten Blütenstandes in *Ler* beobachtet wurde (Clough und Bent, 1998; Ghedira *et al.*, 2013). Bei der Auswahl der Pflanzen zur Transformation wurde darauf geachtet, dass zahlreiche geschlossene Blüten im richtigen Stadium vorhanden waren. Die BASTA-Resistenz zeigt eine Agrobakterien vermittelte Insertion des DNA-Fragments in das Genom der Pflanze. Mittels BASTA-Behandlung wurde auf die Expression des *bar* Gens selektioniert, allerdings garantiert dies offensichtlich nicht die Expression des Zielgens. Während in der *cry3*-Mutante und *Ler* eine große Schnittmenge zwischen BASTA-Resistenz und Expression des Zielgens bestand, war es für Nossen und Col-0 schwierig Pflanzen zu identifizieren, die cry3-HA in detektierbarer Menge exprimierten. Ob dies ein Zufall oder Genotyp spezifisch war, könnte durch die Transformation von mehr Pflanzen und die Verwendung unterschiedlicher Konstrukte überprüft werden. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass das Expressionslevel von cry3-HA zu niedrig war, um detektiert zu werden. Obwohl der 35S-Promotor eine sehr starke Expression ermöglichen sollte, kann die Stärke dennoch von der Insertionsstelle beeinflusst sein. Im verwendeten Vektor reguliert der MAS2-Promotor die Expression von *bar* mit entgegengesetzter Orientierung zum 35S-Promotor. Im Vergleich zum 35S-

Promotor wurden in Karotten geringere Expressionslevel mit MAS2 dokumentiert (Wally *et al.*, 2008), doch ist für den 35S-Promotor auch ein häufiges *gene silencing* bekannt (Matsunaga *et al.*, 2019; Mlotshwa *et al.*, 2010).

Besonders überraschend war das Auftauchen von HA-spezifischen Banden im *Western blot* die etwa 10 kDa kleiner waren als für cry3-HA zu erwarten. Ein vorzeitiges Abbrechen der Transkription oder Translation kann als Grund ausgeschlossen werden, da die HA-Fusion am C-Terminus sitzt. Diskutieren kann man posttranskriptionelle Modifikationen wie ein alternatives Splicing, andere Veränderungen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen oder Ubiquitinierungen können auch die Migration im Gel beeinflussen, jedoch eher zu einem höheren Molekulargewicht hin verschieben. Weiter verwendet wurden nur *A. thaliana* Transformanten, die im *Western blot* ausschließlich cry3-HA der erwarteten Größe zeigten.

4.2.1 Es gibt Hinweise auf die Interaktion von cry3 mit einem großen, löslichen Proteinkomplex oder Nukleinsäuren innerhalb der Chloroplasten

Die Lokalisation von cry3 wurde erstmals von Tatjana Kleine in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten untersucht (Kleine *et al.*, 2003). Mit GFP fusioniertes cry3 wurde dabei in Chloroplasten und Mitochondrien detektiert. Dies passte zu der bioinformatischen Charakterisierung, die Importsequenzen für diese Organellen zeigte. Anhand der Proteinsequenz fanden sich hingegen keinerlei Hinweise für einen Import ins Thylakoidlumen oder andere Kompartimente, auch eine Integration in die Membran erscheint auf Grund der hydrophilen Oberflächenstruktur unwahrscheinlich.

Die Lokalisation von cry3-HA und cry3-GFP wurde in dieser Arbeit in angereicherten Chloroplasten, Thylakoidmembranen und Gesamtextrakten untersucht. Dabei zeigte cry3 ein ähnliches Verteilungsmuster wie die löslichen Chloroplastenproteine GLN2 bzw. RbcL. Einzig in der Fraktion mit Thylakoidmembranen zeigt sich ein im Verhältnis stärkeres Signal für die markierten cry3 Proteine. Ein gerichteter Import in dieses Chloroplastenkompartiment erscheint wegen dem Fehlen einer Signalsequenz unwahrscheinlich. Im Vergleich zu den Proteinen Lhcb1 bzw. Lhcb2, die in der Thylakoid-Membran lokalisiert sind, scheint die Menge an cry3-HA bzw. cry3-GFP gering. Vorstellbar ist die Assoziation von cry3 an die Thylakoidmembran, zum Beispiel über eine Interaktion mit Membranproteinen. Zur genaueren Untersuchung könnten die angereicherten Thylakoidmembranen mit unterschiedlichen Puffern gewaschen werden, um Aufschluss über die Art der Interaktion zu bekommen.

Erste Hinweise, ob cry3 ungebunden in den Chloroplasten vorliegt oder in einem größeren Komplex zu finden ist, lieferte die SEC. Neben dem Elutionsverhalten von cry3 wurde auch RbcL und Lhcb1

beobachtet (siehe Abbildung 3.7.). Die funktionelle Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase besteht aus acht großen (RbcL) und acht kleinen Untereinheiten (RbcS) (Baker, Eisenberg und Eiserling, 1977). Dadurch ergibt sich ein Molekulargewicht von fast 550 kDa. Dieses lösliche Chloroplastenprotein zeigte in der SEC einen deutlichen Peak in einer Fraktion über 232 kDa. RbcL scheint unter diesen Bedingungen also hauptsächlich in seinem nativen Komplex vorzuliegen. Obwohl die verwendete Säule nur in einem Bereich von etwa 10 bis 200 kDa linear war, lässt sich dennoch ein deutlicher Unterschied im Elutionsverhalten von RbcL zu dem in einem wesentlich größeren Komplex enthaltenen Lhcb1 feststellen. Das verwendete Detergenz solubilisiert dabei unlösliche Proteine wie Lhcb1 und kann somit auch das hydrodynamische Volumen stark beeinflussen (Kunji *et al.*, 2008). Es kann daher schwierig sein von der Größe in der SEC auf die tatsächliche Größe des Komplexes zu schließen (Gimpl *et al.*, 2016).

Das Lichtsammelprotein hat eine Masse von unter 25 kDa und ist mit seinen drei Transmembrandomainen integraler Bestandteil der Thylakoidmembran. Die Lichtsammelproteine (Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 (Jackowski *et al.*, 2001)) kommen in der Thylakoidmembran häufig als Trimer vor und binden die zur Lichtsammlung benötigten Chlorophylle und Xanthophylle (Liu *et al.*, 2004). Gleichzeitig sind diese Lichtsammelkomplexe (LHCs) Teil eines größeren Komplexes, dem Photosystem II-LHCII Supercomplex (Wei *et al.*, 2016). Ein Lhcb1-Signal findet sich nahezu über den gesamten Bereich der SEC. Insgesamt erscheint dieses Signal sehr stark, sogar stärker als das für RbcL. Dies erweckt den Eindruck, dass sich mehr Lhcb1 als RbcL im Extrakt befindet, obwohl RuBisCO als das häufigste Protein der Erde gilt (Raven, 2013). Eine größere absolute Menge von Lhcb1 ließe sich durch eine Anreicherung von Thylakoidmembranen in den Chloroplastenextrakten erklären, dieser Rückschluss ist anhand des *Western blots* allerdings nicht möglich. Eine unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Antikörper für Lhcb1 und RbcL kann nicht ausgeschlossen werden, absolute Aussagen sind nur durch Abgleich mit einem Proteinstandards (in diesem Fall Lhcb1 und RbcL) bekannter Konzentration möglich. Der deutliche Peak im Bereich des hohen Molekulargewichts könnte auf die Elution von Lhcb1 in einem Superkomplex oder in Teilen davon sprechen. Allerdings darf nicht vernachlässigt werden, dass es sich um ein Membranprotein handelt und das verwendete Detergenz zur Bildung von Micellen geführt haben kann die das Elutionsverhalten stark beeinflussen können (Kunji *et al.*, 2008).

Der größte Teil von cry3-HA ist in einer Fraktion zu finden, die dem Monomer entspricht, Hinweise auf eine Dimerisierung finden sich unter den gegebenen Bedingungen nicht. Da es sich um eine Überexpression handelt, ist es nicht überraschend, dass der größte Teil von cry3 nicht an einen größeren Komplex assoziiert vorliegt. Die Menge an cry3 ist in dieser Überexpressionslinie hoch, über die Menge des möglichen Interaktionspartners oder die Bedingungen, die zu einer Interaktion führen ist hingegen nichts bekannt. Dennoch zeigt sich auch im Bereich mit hohem

Molekulargewicht ein deutliches Signal für cry3.

Um zu eruieren, ob die späte Elution auf einen Komplex zurückzuführen ist, in dem sich cry3 befindet oder Detergenz Micellen auslösend waren, wurde auch eine SEC ohne Detergenz durchgeführt (siehe Abbildung 3.8). Das Elutionsmuster für cry3-HA ist ähnlich, doch neben den Signalen im Bereich des Monomers und dem Bereich mit hohem Molekulargewicht, findet sich eine weitere Anreicherung in einer Fraktion mit bis zu 212 kDa. In letzterem wird durch den Anti-HA-Antikörper auch eine Bande detektiert, die etwas über dem erwarteten Molekulargewicht für cry3-HA liegt. Diese Bande stellte sich als unspezifisch heraus, eine SEC mit der cry3 Mutante zeigte ebenfalls eine Bande in entsprechender Fraktion und Höhe. Ein Protein, das leichte Kreuzreaktionen mit Anti-HA zeigt, scheint in dieser Fraktion stark angereichert worden zu sein. Durch das Weglassen des Detergenz haben sich die relativen Mengen von Proteinen gänzlich verschoben und durch das Fehlen von Membranproteinen treten lösliche Proteine viel stärker hervor. Für den potentiellen cry3 Komplex (mit einer Größe bis 212 kDa) könnte dies bedeuten, dass dieser in der Probe mit Detergenz schwächer repräsentiert ist und somit unterhalb der Detektionsgrenze der Antikörper liegt. Alternativ könnte das Detergenz direkt eine Ausbildung des Komplexes verhindern bzw. diesen auflösen. Das Auftauchen eines Signals für cry3-HA Signals im Bereich mit hohem Molekulargewicht, auch ohne die Verwendung von Detergenz, lässt mehrere Schlüsse zu: Die Elution von cry3 im Bereich mit hohem Molekulargewicht wurde nicht durch Detergenz Micellen verursacht und es handelt sich nicht ausschließlich um eine Interaktion mit einem Membranprotein, da diese in dieser Extraktion nicht solubilisiert wurden. Neben der Interaktion mit einem großen Proteinkomplex wäre auch die Bindung an Chloroplasten-DNA eine mögliche Erklärung, denn auch diese eluiert spät in einer SEC (Järvi *et al.*, 2011). Ein Verdau mit DNase könnte die Chloroplasten DNA aus der Probe entfernen. Allerdings ist die Stabilität des potentiellen Komplexes unter den Bedingungen die für einen Verdau nötig sind nicht vorhersehbar und daher die Aussagekraft eines solchen Experiments begrenzt.

Die SEC Daten lassen vermuten, dass eine stabile Interaktion von cry3-HA mit anderen Molekülen unter den gegebenen Pufferbedingungen möglich ist. Ob die HA-Fusion Einfluss auf diese Interaktion hat oder diese sogar vermittelt, wurde adressiert indem ebenfalls die cry3-GFP-Fusion untersucht wurde. Das potentielle cry3-GFP Monomer konnte problemlos im *western blot* identifiziert werden, die Signale im hochmolekularen Bereich waren hingegen sehr schwach, aber spezifisch. Dies kann auch den unterschiedlichen Sensitivitäten der Antikörper geschuldet sein. In der Fraktion bis 212 kDa gelang der Nachweis von cry-GFP hingegen nicht. Versuche über eine IP mit Anti-HA oder Anti-GFP den potenziellen Komplex aus den hochmolekularen Fraktionen und der Fraktion bis 212 kDa zu präzipitieren scheiterten. Entweder war die Menge von cry3 in den Fraktionen zu gering, das Fusionsprotein in dem nativen Puffer für den in der CoIP verwendeten

Antikörper nicht frei zugänglich oder andere technische Schwierigkeiten waren Grund hierfür.

4.2.2 Cry3-Fusionsproteine sind in allen DNA enthaltenden Zellkompartimenten zu finden

Die Fusion eines Proteins mit einem fluoreszierenden *tag* wie GFP bietet die Möglichkeit, das Protein in Echtzeit und in lebenden Zellen mit mikroskopischen Techniken zu verfolgen. Die Detektion von cry3-GFP war in *Arabidopsis thaliana* Zellen allerdings nicht trivial. Generell weisen auch Wildtyp-Chloroplasten, die kein Fusionsprotein enthalten, eine Eigenfluoreszenz auf. Geschuldet ist dies den zahlreichen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Pigmenten, die in Pflanzenzellen und speziell Chloroplasten vorkommen (Talamond *et al.*, 2015). Eine oft vernachlässigte Komplikation bei der Verwendung von GFP und den verwandten Varianten ist, dass die Fluoreszenzeigenschaften von einigen äußeren Faktoren abhängen, unter anderem dem pH-Wert (Tsien, 1998). So wird in einem sauren Milieu die Fluoreszenz der verwendeten S65T-Mutante sehr stark gequencht. Das Stroma der Chloroplasten weist zwar einen leicht basischen pH-Wert auf während das Thylakoidlumen sauer ist, doch ist es möglich, dass die direkte Umgebung (beispielsweise die Assoziation an einen großen Komplex oder DNA) zu einem anderen lokalen pH-Wert führt. Dies könnte erklären warum cry3-GFP mikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl es exprimiert wurde, wie die *Western blot* Untersuchungen zeigten (siehe Abbildung 3.6). Eine andere Erklärung wäre die unterschiedliche Sensitivität von *western blot* und der direkten Detektion der Fluoreszenz des Fusionsproteins. Kleine *et al.* gelang es 2003 das auch hier verwendete 35S:cry-GFP Konstrukt in transformierten *Arabidopsis* Protoplasten nachzuweisen und Julia Sommer konnte in mit dem gleichen Konstrukt transformierten *Arabidopsis* Pflanzen ein Signal für GFP in den Chloroplasten finden, welches in der Überlagerung mit dem Chlorophyll Signal zu einer gelb/orangen Färbung führte (Sommer, 2010). Bei dem hier verwendeten Pflanzenmaterial handelt es sich um Nachzuchten dieser von Julia Sommer untersuchten Pflanzen, wie bereits diskutiert ist für den 35S Promotor ein nicht selten auftretendes *gene silencing* bekannt (Matsunaga *et al.*, 2019; Mlotshwa *et al.*, 2010). Schwächere Signale für GFP können dann kaum von der Autofluoreszenz der Organellen unterschieden werden.

Um eine Lösung für dieses Phänomen zu finden und eine fluoreszenzbasierte Beobachtung von cry3 in lebenden Pflanzenzellen zu ermöglichen, wurde eine Fusion mit YFP hergestellt und zunächst mit Hilfe von Agrobakterien in Tabakblättern infiltriert und dort exprimiert. YFP (verwendet wurde *enhanced YFP*) hat etwas andere Eigenschaften als GFP, so zeigt es eine hellere Fluoreszenz bei etwas schnellerem photobleaching (Shaner *et al.*, 2005). Auch für YFP konnte eine pH-Sensitivität festgestellt werden, im Besonderen in Verbindung mit Halogeniden wie Chlorid oder Nitrat-Ionen (Wachter und Remington, 1999). Das Ergebnis der Transformation von Tabak mit cry3-YFP zeigt

eine sehr deutliches Signal in Chloroplasten, wobei die Verteilung nicht gleichmäßig erscheint und auch nicht komplett mit der Chlorophyllfluoreszenz überlappt. Diese lokale Anreicherung unterstützt die Hypothese, der Assoziation von cry3 an einen hochmolekularen Komplex im Stroma der Organellen. Um dies genauer zu klären, wäre eine Cotransformation mit weiteren Fusionsproteinen interessant deren Lokalisation bekannt ist. Beispiele wären ein lösliches stromales Protein und eines, welches Bestandteil der chloroplastären Ribosomen ist. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Fusion mit einem Fluoreszenzprotein die Integration in einem solchen Komplex negativ beeinflussen oder sogar verhindern könnte. Die Effizienz der Integration ließe sich über eine SEC nachvollziehen. Ein weiteres Hindernis ist die Wahl einer geeigneten Fusion, die klar von YFP und der Hintergrundfluoreszenz der Chloroplasten unterscheidbar sein müsste.

Das cry-YFP-Signal war nicht auf die Organellen beschränkt. Die Fluoreszenz im Cytoplasma könnte durch exprimiertes und noch nicht in die Organellen importiertes Protein zustande kommen. Ein erheblicher Teil von cry3-YFP wurde allerdings in den Kern importiert und ist dort im Nukleolus angereichert. Auch Julia Sommer fand cry3-GFP-Signale im Zellkern und speziell im Nukleolus vor (Sommer, 2010). Unfusioniertes YFP ist zwar klein genug, um in den Zellkern zu diffundieren, doch erscheint dann der Nukleolus ungefärbt. In Fusion mit cry3 ist das resultierende Protein mit etwa 92 kDa vermutlich zu groß, um ohne einen gezielten Import in den Zellkern zu gelangen. Allerdings gibt es keine exakte Größe ab der eine Diffusion in den Kern nicht mehr möglich ist. Vielmehr scheinen die Kernporen größere Proteine nach relativ weich verlaufenden Grenzen auszuschließen, für die mehr Faktoren als die alleinige Größe ausschlaggebend sind (Timney *et al.*, 2016). In einer *Yeast-two-hybrid*-Analysen wurde eine mögliche Interaktion von cry3 mit NUP205 gefunden, einem inneren Protein der Kernporen in *Arabidopsis* (siehe 3.4.2 und 4.4.2.2). Ob dies auf einen möglichen gerichteten Transport hindeutet, bzw. Teil des Imports ist, müssen weitere Studien zeigen.

Die erzielten Daten zeigen, dass cry3 offensichtlich in jedem Zellkompartiment zu finden ist welches DNA enthält (Tatjana Kleine zeigte cry3 in Mitochondrien (Kleine *et al.*, 2003)). Hieraus resultiert die Frage, ob dies auf einen funktionellen Zusammenhang hindeutet. Die DNA-bindenden Eigenschaften von cry3 sind bekannt und *in vitro* hinreichend belegt (Pokorny *et al.*, 2008). Mehrere Ansätze um eine DNA- oder RNA-Bindung von cry3 *in planta* nachzuweisen, sind bisher allerdings ohne positives Ergebnis geblieben (siehe Abbildung 6.8 und Masterarbeit Tanja Göbel). Mit ColIPs und *pull down assays* wurde versucht, eine Bindung von Nukleinsäuren aus Chloroplastenextrakten an das Cryptochrom zu zeigen. Besonders in Bezug auf die ColIPs ist eine Unterschreitung der Detektionsgrenze des verwendeten SYBR-Greens zum Nachweis von Nukleinsäuren aber wahrscheinlich. Das radioaktive *end labeling* der potentiell eluierten Nukleinsäuren könnte hier weiteren Aufschluss liefern (Porecha und Herschlag, 2013).

4.2.3 Im Licht wird die Expression von *cry3* schnell und durch mehrere Photorezeptoren induziert

Die Expression von *CRY3* wurde in Zusammenarbeit mit den Bachelor Studenten Felix Hamann, Heval Atas und Alexander Schabasian unter verschiedenen Lichtbedingungen und in unterschiedlichen Genotypen untersucht. Zwar lagen schon im Vorfeld einige Daten zur Expression aus *Microarrays*, sowie der Arbeit von Stefan Reisbacher vor, doch wurden diese nicht unter exakt vergleichbaren Versuchsbedingungen erzielt. Bei dem hier gezeigten Datensatz wurden sowohl Anzucht der Keimlinge als auch RNA-Extraktion, DNase-Behandlung, reverse Transkription und real time PCR stets nach dem gleichen Protokoll durchgeführt (siehe auch 2.3.5).

In den untersuchten Genotypen *Ler*, *Col-0* und *Nossen* führt die Belichtung mit Blaulicht zu einer starken Induktion von *CRY3*, mit Transkriptmengen, die bereits nach etwa 2 Stunden um das fast 20 bis über 30fache anstiegen (siehe Abbildung 4.1 a). Im weiteren Verlauf über 24 Stunden zeigen sich einige Unterschiede zwischen den Genotypen. Während in *Nossen* die Induktion nach zwei Stunden am stärksten ist und über 24 Stunden bis fast auf den Dunkelwert sinkt, bleibt die Expression in *Ler* sehr konstant. In *Col-0* ist ein weiteres Maximum nach 12 Stunden zu erkennen, doch deutet der sehr große Standardfehler auf Messungenauigkeiten bzw. eine sehr hohe Variabilität innerhalb der Messwerte hin. Die Dunkelproben zeigen eine gleichbleibend niedrige Expression von *CRY3*. Mögliche circadiane oder diurnale Einflüsse auf die Expression sollten hier weitgehend unbeachtet bleiben. Es wurde darauf geachtet, dass das etiierte Wachstum nicht nur ohne Licht, sondern auch unter einer konstanter Temperatur von etwa 20°C erfolgte (Thines und Harmon, 2010). Eine

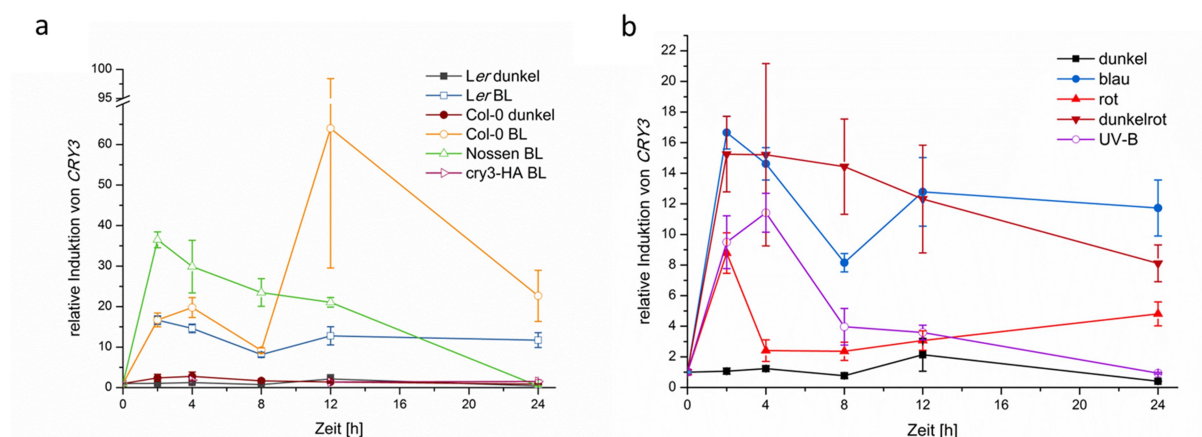


Abbildung 4.1 Die Transiens der Induktion von *CRY3* ist Licht und Genotypabhängig.

(a) drei Tage alte, auf Filterpapier gewachsene, etiierte Keimlinge des *Ler*, *Col-0* und *Nossen*-Wildtyps sowie der *cry3-HA* exprimierenden Linie wurden unterschiedlich lange mit Blaulicht (471 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (BL) bestrahlt oder im Dunkeln belassen. In (b) wurden entsprechende *Ler*-Keimlinge mit blau (471 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), rot (660 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), dunkelrot (748 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) oder einem UV-B-Puls ($280\text{ bis }320\text{ nm}$, $3\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 15 min) bestrahlt. Die *CRY3*-Transkriptmenge wurde mittels q-RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten und deren Standardfehler. Normiert wurde gegen Actin und den Mittelwert der 0 h Proben.

diurnale Regulation der *CRY3*-Transkriptmenge in Keimlingen konnte schon in früheren Experimenten gezeigt werden (Reisbacher, 2009) und *Microarray*-Daten deuten auch auf eine circadiane Expression von *CRY3* in Keimlingen und adulten Blättern hin (NASCARRAYS- 108 von Dr. Kieron Edwards; NASCARRAYS- 493 von James *et al.* (2008)).

In allen Ökotypen ist die blaulichtabhängige Induktion sehr schnell und bereits nach zwei Stunden sehr deutlich. Ein vergleichbares Ergebnis fand eine *Microarray*-Untersuchung für die Expression von *CRY3* in Kotyledonen und den Sprossspitzen (López-Juez *et al.*, 2008). Anhand der Expressionsmuster der auf dem CHIP enthaltenen Gene erstellten die Autoren eine Gruppierung. *Cry3* wurde dabei einer Gruppe von Genen zugeordnet deren Mitglieder eine Transkriptionsfaktor-Aktivität bzw. eine Antwort auf Stress/Lichtreiz gezeigt haben. Überrepräsentiert sind in dieser Gruppe Proteine, die Einfluss auf Transkription, Proteinschicksal, sowie Hormon- und Abwehrmechanismen zeigen. Das Expressionsmuster von *CRY3* könnte ein Anhaltspunkt sein, dass es in einem ähnlichen Bereich agiert.

Eine interessante Frage ist, ob die Expression von *CRY3* nur auf transkriptioneller Ebene oder auch posttranskriptionell reguliert wird. Um dies genauer zu beleuchten, wurde die *cry3*-HA exprimierende Linie während der Deetiolierung auf Protein und Transkriptmenge untersucht. Der 35S-Promotor ist nicht lichtreguliert; wie zu erwarten, zeigte sich auf Transkriptebene keinerlei Induktion, die sich relevant vom Dunkelwert abhob (siehe Abbildung 4.1a). Auch die Proteinmenge zeigte keine signifikante Änderung nach Belichtung der Keimlinge (siehe Abbildung 3.5b). Hinweise darauf, dass es posttranskriptionell zu einem verstärkten Abbau oder einer Stabilisierung des Proteins in Abhängigkeit von Licht kommt, konnten somit nicht gefunden werden. Da die verfügbaren Antikörper gegen *cry3* nicht sehr spezifisch und sensitiv sind, war es schwierig die Expression des Proteins im Wildtyp zu verfolgen und quantitative Aussagen über die Proteinmenge zu treffen. Die absolute Menge an *CRY3*-Transkript ist durch die Expression unter Kontrolle des 35S-Promotors um ein vielfaches höher als unter dem pflanzeigenen Promotor, auch im Vergleich zu dem Maximum zwei Stunden nach Einsetzen des Lichts. Durch diese Diskrepanz ist es möglich, dass eine Feinregulation auf posttranskriptioneller Ebene verborgen bleibt. Zusammengefasst sprechen die Daten dennoch dafür, dass die Regulation der *cry3* Proteinmenge hauptsächlich auf Ebene der Transkription stattfindet.

Neben Blaulicht wurde auch der Einfluss von kontinuierlichem Rot- und Dunkelrotlicht, sowie eines UV-B-Pulses auf die Transkriptmenge von *CRY3* in *Ler* untersucht (siehe Abbildung 4.1b). Während Dunkelrot zu einem vergleichbaren Effekt wie Blaulicht führt, ist die Induktion durch UV-B- und rotes Licht sehr transient. Im Falle von UV-B überrascht dies kaum, da lediglich ein Lichtpuls gegeben wurde und daher zu erwarten ist, dass das Signal nach einer gewissen Zeit abfällt.

Die transiente Induktion durch Rotlicht lässt sich durch die Untersuchung verschiedener Photorezeptor-Mutanten schlüssig erklären (siehe Abbildung 4.2). Nach zwei Stunden Inkubation im Dunkeln zeigt sich in keiner getesteten Linie ein nennenswerter Unterschied zur Ausgangsprobe, anders unter den verschiedenen Lichtbedingungen. Unter Blaulicht ist eine deutliche Induktion des *CRY3*-Transkripts in den Wildtypen aber auch der *cry1*-, *cry1cry2*- und *phyA*-Mutante zu verzeichnen. Während die Belichtung in den Wildtypen zu einem Anstieg von *CRY3* um einen Faktor von etwa 17 führte, reduzierte sich diese Induktion in der *phyA*- und *cry1cry2*-Mutante nur geringfügig auf das etwa 14fache. Erst die Deletion von *cry1*, *cry2* und *phyA* führt zu einer Expression, die nicht mehr vom Dunkelwert zu unterscheiden ist. Somit wird die Expression unter Blaulicht zumindest von einem der beiden Cryptochrome und *phyA* reguliert. Um dies noch genauer einzugrenzen könnten *phyAcry1*- und *phyAcry2*-Mutanten generiert und untersucht werden.

Auch wenn *phyB* der dominante Rotlichtphotorezeptor ist, hat er keinen Einfluss auf die Expression von *CRY3* unter dieser Lichtbedingung. Die *phyB*-Mutante ist unter Rotlicht nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Anders in der *phyA*- und *phyAphyB*-Doppelmutante, die Induktion von *CRY3* ist hier

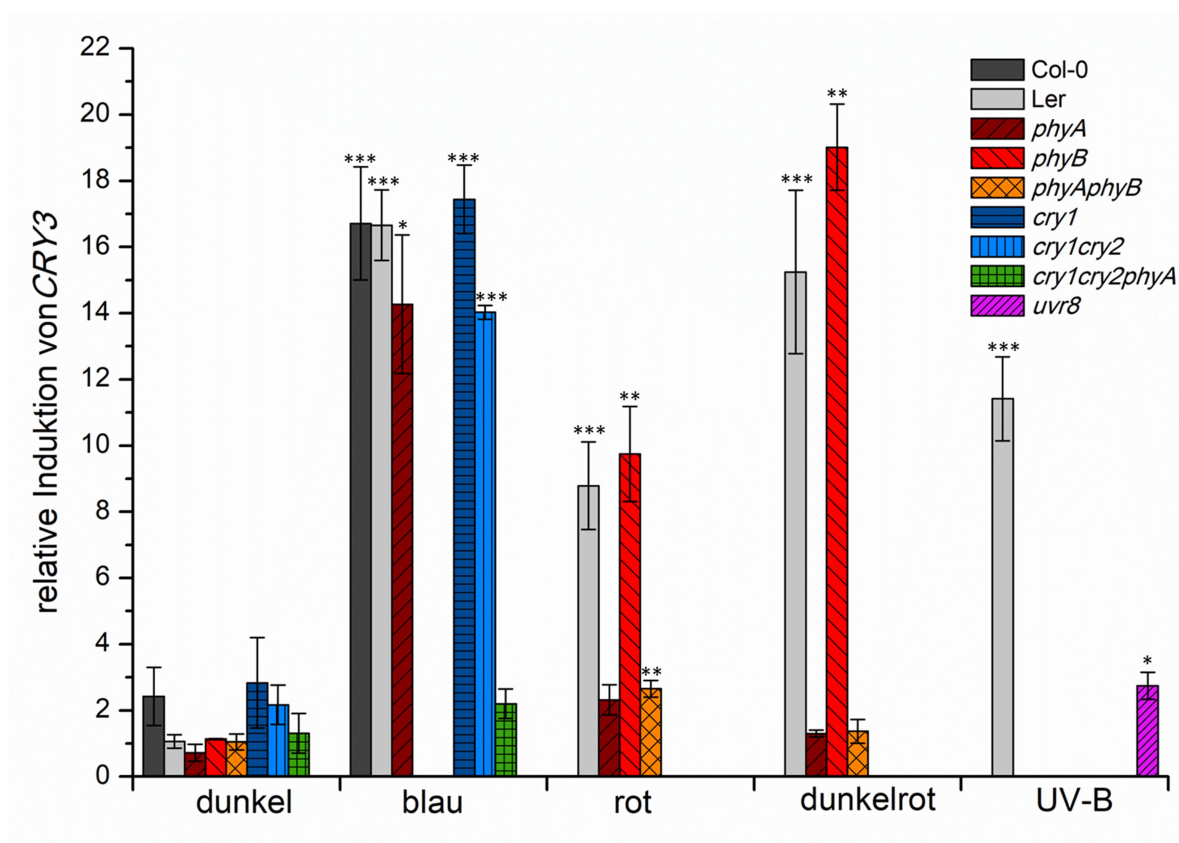


Abbildung 4.2 Die Induktion von *CRY3* wird durch mehrere Photorezeptoren reguliert

Drei Tage alte, auf Filterpapier gewachsene, etoilierte Keimlinge der *Ler*-, *Col-0*- und *Nossen*-Wildtypen sowie der *cry3*-HA exprimierenden Linie, wurden 2 Stunden mit blau (471 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), rot (660 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), dunkelrot (748 nm , $50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) belichtet oder einem UV-B-Puls ausgesetzt ($280\text{ bis }320\text{ nm}$, $3\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 15 min) dem zwei Stunden Dunkelheit folgten. Die *CRY3*-Transkriptmenge wurde mittels q-RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens drei biologischen Replikaten und deren Standardfehler. Normiert wurde gegen Actin und den Mittelwert der 0 h Proben.

nur gering höher als in der Dunkelprobe. Der t-Test deutet einen signifikanten Unterschied für die etwa 2,5fache Induktion von *cry3* in der *phyAphyB*-Doppelmutante im Vergleich zum Ausgangswert (0 Stunden) an. Die *cry3*-Expression in der *phyA* Mutante unterscheidet sich im t-Test hingegen nicht signifikant vom Ausgangswert, weshalb es sich bei der Induktion in der *phyAphyB*-Doppelmutante auch um Messungenauigkeiten handeln könnte. Während Phytochrome durchaus in der Lage sind blaues Licht zu absorbieren, gilt dies umgekehrt nicht für Cryptochrome. Vorstellbar wäre aber eine untergeordnete Beteiligung von *phyC* bis *phyE* bei der Regulation der *CRY3* Expression, die jedoch nicht in der Lage sind, das Fehlen von *phyA* annähernd zu kompensieren. Dass *phyA* im Bezug auf die Expression von *CRY3* unter Rotlicht der dominante Photorezeptor ist, erklärt das transiente Expressionsmuster unter dieser Lichtbedingung. Da die Pfr-Form von *phyA* lichtlabil ist wird diese unter kontinuierlichem Rotlicht schnell abgebaut und das Signal endet nach kurzer Zeit. Die Funktion von *phyA* als Rezeptor für eine Rotlicht-HIR ist nicht neu und wurde bereits 2006 für frühe Rotlicht-induzierte Gene (*early response genes*) beschrieben (Tepperman *et al.*, 2006).

Wenig überraschend war das Ergebnis unter Dunkelrotlicht, die starke und anhaltende Induktion von *CRY3* scheint vollständig von *phyA* vermittelt zu werden. Die Expression von *CRY3* in der *phyA*-Mutante entspricht etwa dem Dunkelwert. In diesem Zusammenhang ist interessant zu erwähnen, dass Alexander Schabasian auch untersuchte, ob die Induktion von *cry3* durch eine VLFR zu erklären ist. Doch im Gegensatz zu *CAB3* wurde die Expression von *CRY3* unter einem schwachen Lichtpuls kaum induziert. *PhyA* scheint also tatsächlich nur über eine HIR die Expression von *CRY3* zu regulieren.

Während *phyA* in einem Komplex mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren (unter anderem *HY5* und *PIFs*) direkt an die Promotorregionen einiger dunkelrotregulierter Gene bindet, ist dies im Zusammenhang mit *cry3* nicht der Fall (Chen *et al.*, 2014). Dennoch scheint *pif3* ein Partner der Signaltransduktionskette zu sein, über welche *CRY3* reguliert wird, wie Stefan Reisbacher basierend auf Microarray-Daten (Monte *et al.*, 2004; Reisbacher, 2009) und Mutantenanalysen zeigen konnte. Die rot/dunkelrot Expression von *CRY3* sinkt in der *pif3* Mutante deutlich, aber nicht bis auf den Dunkelwert. Gleiches gilt für eine *pif1*-Mutante in welcher die *CRY3*-Transkriptmenge unter Dunkelrotlicht deutlich gesenkt wurde. Die Regulation über *PIFs* kann auch die Transienz der Expression von *CRY3* erklären, da diese im Licht abgebaut werden. Teppermann und Monte fanden diese frühen durch *phyA* induzierten Gene besonders an der Biogenese von Chloroplasten beteiligt, was durchaus auch mit der Lokalisation von *cry3* übereinstimmen könnte. Dabei sind *PIFs* auch an der Aktivierung von chloroplastenkodierten Genen beteiligt, da die *PIF* Degradation mit der Aktivierung der plastidären PEP RNA Polymerase gekoppelt ist (Yang *et al.*, 2019; Yoo *et al.*, 2019). Die *CRY3* Transkriptmenge in der *pif1* und der *pif3* Mutante zeigte im Dunkeln keinen Unterschied

zum Wildtyp, PIF1 und PIF3 scheinen die Transkription von *CRY3* somit nicht aktiv zu hemmen und für das G-box-Motiv im Promotorbereich von *CRY3* konnte keinerlei Bindung von PIF1 oder einem anderen PIF gefunden wurde (Oh *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2014). Der genaue Mechanismus der positiven Regulation von *CRY3* über PIF1 und PIF3 ist weitgehend unbekannt, wahrscheinlich ist die Beteiligung von mindestens einem anderen Protein. Beispielsweise könnte die Expression von einem lichtabhängigen Transkriptionsfaktor durch PIFs schon im Dunkeln induziert werden, doch erst eine lichtabhängige Aktivierung würde die Expression von *CRY3* induzieren. Die lichtabhängige Degradation der PIFs würde in diesem Modell die Transienz der lichtabhängigen Expression von *CRY3* erklären. Aber auch eine zusätzliche, von PIF1 und PIF3 unabhängige, Inhibierung der *CRY3* Expression im Dunkeln ist vorstellbar. Neuere Untersuchungen für ein DASH-Cryptochrom aus Braunalgen zeigte eine negative Kontrolle der *sjCRY-DASH* Transkriptmenge durch eine miRNA (*novel-m3234-5p*) (Yang *et al.*, 2020). Allerdings wird die Expression von *sjCRY-DASH* nicht durch Rotlicht, sondern nur durch Blau und Weißlicht induziert, was eine Anpassung an das Habitat der Braunalgen sein kann. Doch auch in *Arabidopsis thaliana* ist ein Einfluss von miRNAs auf die Photomorphogenese, auch unter Rotlicht, bekannt (Sun *et al.*, 2018). Genomweite Untersuchungen lieferten allerdings keine Anhaltspunkte dafür, dass *CRY3* Transkripte ein direktes Ziel der untersuchten miRNAs sind (Lin *et al.*, 2017).

Die gefundene UVR8 vermittelte Induktion von *CRY3* durch UV-B wurde bereits beschrieben (Brown *et al.*, 2005). Die *uvr8*-Mutante zeigte nur eine geringe Induktion von *CRY3* nach UV-B-Puls. Eine einfache Erklärung für die detektierbare Induktion in der Mutante wäre eine gewisse Aktivität eines pflanzlichen Cryptochromes oder Phytochroms, da diese auch noch in der Lage sind in geringem Rahmen Licht im UV-Bereich zu absorbieren.

Zusammengefasst scheint die Regulation von *CRY3* hauptsächlich auf Ebene der Transkription abzulaufen. Beteiligt sind mindestens *phyA*, *cry1* und/oder *cry2* und UVR8. Die Regulation über *phyA* ist dabei nicht direkt über die Bindung an die Promotorregion von *CRY3* vermittelt und eine beteiligte Signaltransduktionskomponente sind PIFs. Die schnelle lichtabhängige Induktion von *CRY3* spricht für eine Beteiligung während dem Licht-Dunkel-Übergang oder an frühen Prozessen der Deetiolierung.

4.3 Phänotypen der *cry3*-Mutante

4.3.1 Die *cry3*-Mutante reagiert während der Deetioloierung von Keimlingen schwächer auf Blaulicht

Ein bereits bekannter Phänotyp der *cry3*-Mutante ist eine geringere Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums durch Blaulicht (Göbel, 2011). Der Effekt ist mit etwa 20% deutlich schwächer als beispielsweise für die *cry1*-Mutante und es ist ausschließlich die Länge des Hypokotyls betroffen. Die Kotyledonen sind geöffnet und grün. Da diese Prozesse unter Blaulicht hauptsächlich durch die pflanzlichen Cryptochrome vermittelt wird, ist der geringe Effekt von *cry3* nicht überraschend. Um den Phänotyp zu verifizieren, wurde das Experiment nicht nur wiederholt, sondern auch von einer anderen Person (Maribel Dionisio-Sese) durchgeführt. Das Ergebnis konnte dabei bestätigt werden (siehe 3.3.1 und Abbildung 6.1). Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich die Hypokotyllängen der *cry3* Mutante und des Wildtyps tatsächlich unterscheiden und weder Messungenauigkeiten noch Präferenzen des Experimentators dieses Ergebnis fälschlich erbrachten.

Der beobachtete Effekt ist spezifisch für Blaulicht, da beim Dunkelwachstum kein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp zu erkennen war, auch nicht unter Rot- und Dunkelrotlicht. Eine Dosisresponskurve zeigt, dass der Unterschied zwischen *cry3* und Nossen bei etwa $10 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ am größten ist. Bei starkem Licht mit $50 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ oder sehr schwachem mit $1 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ist der Unterschied wesentlich geringer. Es muss hierbei bedacht werden, dass in der Pflanze noch andere Photorezeptoren unter Blaulicht operieren. Besonders *cry1* und *cry2* kommen eine wichtige Bedeutung während der blaublichtabhängigen Deetioloierung zu. Aber auch für Phytochrome (besonders phyA) sind Blaublichtantworten bekannt. Interessant wäre daher auch die Betrachtung einer *cry1cry2cry3*-Tripelmutante. Bisherige Versuche, diese durch Kreuzung zu generieren, scheiterten allerdings. Aus ungeklärten Gründen gab es wiederholt Probleme, in Kreuzungen die *cry2*-Mutation nachzuweisen. Auch neuere Ansätze, die die Mutationen in *CRY1* und *CRY2* mit Hilfe hochauflösender Schmelzkurven von PCR-Fragmenten dokumentierten (siehe 2.3.6), lieferten kein klares Ergebnis für den Erfolg der Kreuzung. In den einzelnen Linien (*cry2* und *cry1cry2* Mutanten) konnten damit die ausgetauschten Basenpaare nachgewiesen werden, die zur Entstehung eines Stopcodons führen und somit die Bildung von biologisch aktivem Protein unterbinden. In der Kreuzung zur Tripel-Mutante konnte die Mutation in *cry2* in den getesteten Transformanten nicht gefunden werden.

Auch wenn die Kreuzung und Selektion der Tripelmutante schließlich gelingen würde, bestünde das Problem, dass hierfür auch die Wildtypen Nossen und *Ler* oder Col-0 vermischt würden. Die

cry1cry2-Mutante befindet sich im *Ler*- bzw. Col-0 Hintergrund und die *cry3*-Mutante im Nossen-Hintergrund. In Bezug auf die Hypokotyllängen ist der Unterschied zwischen den Wildtypen relativ gering, allerdings ist schwer vorherzusagen wie sich die Kreuzung auf diese und andere physiologische Eigenschaften der Pflanze auswirkt. Eine bessere Alternative könnte daher die gezielte Deletion von *cry3* im *cry1cry2*-Mutanten-Hintergrund mittels CRISPR/Cas9 sein (Jiang *et al.*, 2014).

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Überexpression von *cry3* zu einer Verkürzung der Hypokotyle unter Blau- und Rotlicht führte. Ein klarer, lichtabhängiger Einfluss kann daraus nicht abgeleitet werden. Möglicherweise wirkt sich die Überexpression leicht negativ auf das Wachstum oder die Keimung aus. Der Vergleich mit einer anderen Überexpressionslinie, die keine Beteiligung an der Lichtsignaltransduktion hat, könnte in diesem Zusammenhang aufschlussreich sein.

Nicht abschließend geklärt wurde die Frage, ob der beschriebene Phänotyp tatsächlich und ausschließlich durch die Deletion von CRY3 bedingt ist. Die Expression von *cry3*-HA im *cry3* Mutantenhintergrund führt zu keiner Komplementation. Allerdings ist nicht bekannt ob *cry3*-HA physiologisch aktiv ist. Weitere Linien die nur *cry3*, *cry3*-GFP oder *cry3*-YFP in der *cry3*-Mutante exprimieren, waren nicht verfügbar. Entsprechende Konstrukte wurden im Zuge dieser Arbeit in die *cry3*-Mutante transformiert und können in Zukunft analysiert werden.

Auch eine andere unabhängige Deletionsmutante von *cry3* war leider nicht verfügbar, jedoch die Linie GB#12, die nur eine stark verkürzte Version von *cry3* exprimiert. In einigen Versuchen zeigte sich eine schwächere Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums von GB#12 Keimlingen im Blaulicht, in anderen war allerdings kein Unterschied zum Wildtyp sichtbar. Als variabel zeigte sich dabei besonders das Saatgut des Col-0 Wildtyps. Während bei der Saatgutgewinnung für *cry3* und Nossen Wildtyps die Samenanzucht und Ernte parallel abliefen, war dies für GB#12 und Col-0 nicht der Fall. Unterschiedliche Temperaturen während der Anzucht der Parentalgeneration, sowie unterschiedliche Stressbedingungen, können einen Einfluss auf Keimung, Wachstum und Anpassungsfähigkeit der Nachkommen haben (Blödner *et al.*, 2007). An solchen epigenetischen Variationen sind unter anderem DNA-Methylierungen und die Steuerung der Frequenz der Homologenrekombination beteiligt (Migicovsky und Kovalchuk, 2013). Es wäre daher sinnvoll in einer neuen Nachzucht GB#12 und Col-0 parallel anzuziehen, zu ernten und gegebenenfalls erst die zweite Folgegeneration zu untersuchen. Zwar sind die Anzuchtbedingungen zur Saatgutproduktion in den Wuchskammern theoretisch sehr konstant, doch kann im Nachhinein nicht ausgeschlossen werden, dass technische Zwischenfälle einen Einfluss hatten und so zu der Variabilität innerhalb des Col-0 Saatgutes führten.

Wenn die geringere Sensibilität gegenüber Blaulicht, während der Deetiolierung von Keimlingen, nicht auf die Deletion von *CRY3* zurück zu führen wäre, wäre eine wahrscheinliche Erklärung, dass eine weitere und unbekannte Mutation in dieser Linie stattgefunden hat. Ebenfalls untersucht wurde daher eine Rückkreuzung der Mutante zum Wildtyp Allel von *CRY3*. Dass auch die potentiell unbekannte Mutation zurück gekreuzt wurde, wäre nur dann wahrscheinlich, wenn sich diese in unmittelbarer räumlicher Nähe zu *CRY3* befinden würde. Die Rückkreuzung wurde RikenWT genannt. Zwar zeigt RikenWT keinen Unterschied zu Nossen in Bezug auf die blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums, doch war die Keimfähigkeit des Saatguts so schlecht, dass der Probenumfang unzureichend war. Auch hier wäre eine Wiederholung des Experiments mit neuem Saatgut hilfreich. Möchte man einen direkten Einfluss der Transposoninsertion ausschließen, könnte man eine weitere und *cry3* unabhängige Mutante des Riken Instituts mit gleicher Insertion untersuchen. Betroffen sein sollte ein bekanntes Gen, das nicht an der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums beteiligt ist.

Zwar konnte nicht abschließend bewiesen werden, dass *cry3* einen Einfluss auf die blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums hat, doch bleibt dies die naheliegende Erklärung für den Phänotyp der Mutante. Vielversprechend wäre die Untersuchung einer Linie, die *cry3* im Hintergrund der *cry3*-Mutante exprimiert. Allerdings ist der Nachweis des Cryptochroms in diesen Extrakten nicht trivial, da die verfügbaren Antikörper nur wenig spezifisch sind. Über eine qRT-PCR und gegebenenfalls *Western blots* mit Chloroplastenproteinextrakten sollte der Nachweis auf Transkript und Proteinebene jedoch gelingen (vergleiche Doktorarbeit Stefan Reisbacher). Sollte für die biologische Funktion allerdings die Kontrolle von *cry3* durch den eigenen Promotor oder sogar die Position im Genom entscheidend sein, wird auch dieser Ansatz der Komplementation scheitern. Mit der mittlerweile entwickelten Technik der CRISP/Cas9 könnten auch gezielt Mutationen in *CRY3* eingebracht und die neu generierten *cry3* Mutanten auf ihre Reaktion während der Deetiolierung untersucht werden (Jiang *et al.*, 2014; He *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018).

4.3.2 Die *cry3* Mutante zeigt ein verändertes Chloroplastenproteom

Die Lokalisation von *cry3* in den Chloroplasten ist eine Besonderheit dieses potentiellen Photorezeptors. Da die durchgeführten Mikroarray Analyse von Brudler *et al.* (2003) eine regulatorische Funktion von *Synechocystis* cry DASH nahelegte, untersuchte Stefan Reisbacher eine regulatorische Funktion von *Arabidopsis thaliana* *cry3* in Bezug auf die Transkription chloroplasten-kodierter und lichtregulierter Gene. Mittels qRT-PCR konnte kein deutlicher Einfluss der *cry3*-Deletion auf die Transkriptmengen von *RbcL*, *psaA*, *psbD*, 16s rRNA und *rps11* gefunden werden. Eine mögliche Regulation kann aber nicht nur auf Ebene der Transkription stattfinden. Auch

während der Translation, posttranskriptionellen Modifikation oder dem Proteinabbau könnte *cry3* regulatorisch aktiv sein. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen wurde eine 2D-DIGE Analyse durchgeführt.

In der Untersuchung der *cry3*-Mutante zeigte die 2D-DIGE-Analyse des Chloroplastenproteoms insgesamt 19 differentielle Proteinspots. Die Überexpression von *cry3* scheint hingegen keinen detektierbaren Einfluss auf die Abundanz der untersuchten Proteine zu haben. Dies ist nicht vollkommen überraschend, da bereits die Untersuchung des Einflusses von *cry3* auf das blaulichtabhängige Hypokotyllängenwachstums einen Einfluss der Deletion von *cry3*, nicht aber dessen Überexpression nahelegte. Da bislang nichts über die Art der *cry3*-abhängigen Signalweiterleitung bekannt ist, ist es durchaus möglich, dass die Überexpression physiologisch irrelevant ist, auch wenn dies für andere Photorezeptoren, darunter auch die pflanzlichen Cryptochrome, nicht gilt. In diesem Zusammenhang bleibt jedoch zu bedenken, dass die *CRY3*-Transkriptmenge, wie bereits erwähnt, in Keimlingen diurnal und lichtabhängig kontrolliert wird (siehe 4.2.3 und Reisbacher, 2009). Diesen Daten gemein ist besonders eine hohe *CRY3*-Transkriptmenge zu Beginn des subjektiven Tags. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch das für die Chloroplastenisolation benötigte Blattmaterial geerntet (1 Stunde nach Beginn des Lichtzyklus), da hier der stärkste Einfluss der Deletion von *CRY3* zu vermuten war.

Viele der in der Mutante angereicherten Proteine haben eine Enzym- oder regulatorische Funktion. So werden die Spliceformen 1 und 2 der RA in der *cry3* Mutante um einen Faktor von 1,52 bis 1,81 angereichert. Dieses Protein ist für die lichtabhängige Aktivierung von RuBisCO essentiell und erfüllt somit eine entscheidende regulatorische Funktion im photosynthetischen Kohlenstoffmetabolismus der Pflanzen (Zhang *et al.*, 2002). PGK1 und PRK sind Enzyme des Calvinzyklus und zeigen eine ähnlich starke Anreicherung in der *cry3*-Mutante wie die RCA. PRK katalysiert die Bildung von Ribulose-1,5-bisphosphat, welches daraufhin von RuBisCO carboxyliert oder oxygeniert werden kann. Die Carboxylierung führt zu der Entstehung von 3-Phosphoglycerat, welches durch die PGK1 phosphoryliert wird. PGK1 katalysiert jedoch auch die Umkehrreaktion, bei der ATP freigesetzt wird und ist somit an der Glykolyse in Chloroplasten beteiligt (Plaxton, 1996). Ein weiteres Enzym, das in Abwesenheit von *cry3* in größerer Menge vorliegt, ist die GLN2, die an der Photorespiration (zu der es durch die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat durch RuBisCO kommt) und der Aminosäurebiosynthese beteiligt ist. Als zentraler Schlüsselpunkt all dieser Prozesse könnte RuBisCO angesehen und eine mögliche Funktion von *cry3* an der Regulation des Calvin/Benson Zyklus diskutiert werden.

PSBO1/2, die Teil des Sauerstoff-freisetzenden Komplexes des PSII und somit an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligt sind, sind in der *cry3*-Mutante hingegen abgereichert. Weitere

Proteine, die in der Mutante weniger abundant waren, sind die Plastid-Lipid assoziierten Proteine PAP1, 2 und eventuell 6. Da PAP6 nur in einem Spot zusammen mit PAP2 und PSBO1/2 gefunden wurde, kann keine eindeutige Aussage über die relative Proteinmenge von PAP6 getroffen werden, denn es ist nicht klar welches Protein die detektierte Änderung des Spots hervorgerufen hat. Die genaue Funktion von PAP1 und 2 ist unklar, hauptsächlich scheinen sie als Strukturmolekül zu fungieren.

Weiterhin als in der Mutante angereichert wurde EFTU identifiziert, welches an der Translationselongation beteiligt ist. Die Interaktion oder Regulation eines Proteins, welches selbst eine regulatorische Funktion während der Translation besitzt, kann wiederum Einfluss auf die Abundanz zahlreicher anderer Proteine nehmen. Die hier als differentiell identifizierten Proteine sind allerdings ausnahmslos im Kern kodiert, werden also in die Chloroplasten importiert und nicht dort gebildet. Da cry3 nicht nur in den Organellen lokalisiert ist, sondern auch im Nucleolus und Zellkern zu finden ist, könnte es auch direkt Einfluss auf die Transkription im Kern bzw. rRNA Prozessierungs-Wege haben (Sáez-Vásquez und Delseny, 2019). Vorstellbar wäre dabei auch eine direkte Interaktion mit RNA. Versuche eine Bindung von Nukleotiden mittels CoIP von cry3-GFP zu finden scheiterten bisher, wie bereits diskutiert (siehe Abbildung 6.8 und 4.2.1).

Eine Gemeinsamkeit für alle identifizierten Proteine zu finden, die auf die Art der Regulation durch cry3 schließen ließe, ist schwierig. Für viele der gefundenen Proteine sind posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierungen (PGK1, RCA, PAP1, PAP6) (Reiland *et al.*, 2009) oder auch *peptidyl-cysteine S-nitrosylations* (EFTU, PRK, PGK1) (Romero-Puertas *et al.*, 2008) bekannt. S-Nitrosylierungen werden durch Stickstoffmonooxid (NO) vermittelt, dem eine Rolle als Signalmolekül zukommt. Diese redoxsensitive posttranskriptionelle Modifikation ist unter anderem an der Regulation der Apoptose beteiligt (Mannick und Schonhoff, 2004) und dabei besonders als Abwehrmechanismus gegen Pathogene von Bedeutung (Holzmeister *et al.*, 2011). Aber auch an den Antworten auf abiotischen Stress spielen S-Nitrosylierungen eine entscheidende Rolle (Fancy *et al.*, 2017). Die physiologische Antwort der Pflanze ist dabei nicht auf einzelne Zellen beschränkt, über S-Nitrosylierungen werden Proteine modifiziert, die wichtige Punkte der Signalweiterleitung über Phytohormone bilden, so zum Beispiel auch im *Auxin-signaling* (Zhang *et al.*, 2019; Iglesias *et al.*, 2018).

Posttranskriptionelle Modifikationen können das Laufverhalten von Proteinen auf 2D-Gelen stark beeinflussen. Dies kann das Auftreten der gleichen Proteine in mehreren Spots bewirken, wie es für viele der hier identifizierten Proteine beobachtet wurde. Allerdings zeigten Proteine, die in mehreren Spots auftauchten, immer eine sehr ähnliche Regulation. Sollte cry3 an dem Anfügen einer Modifikation beteiligt sein, wäre zu erwarten, dass der modifizierte und unmodifizierte Spot

eine unterschiedliche relative Abundanz im Vergleich von Wildtyp und Mutante zeigen. Da jedoch nicht alle, sondern nur differentielle Spots mittels MALDI-TOF identifiziert wurden, ist nicht bekannt ob die gefundenen Proteine in weiteren Spots vorliegen, die unter den gewählten Bedingungen nicht als signifikant unterschiedlich identifiziert wurden.

6 der 10 gefundenen Proteinen sind Ziele für Thioredoxin (TRX) in *Arabidopsis thaliana* (RCA, PRK, GLN2, PSBO1, PSBO2, PAP6)(Hall *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2004). Für EFTU aus Spinat konnte auch eine Interaktion mit TRX gefunden werden (Balmer *et al.*, 2003). Thioredoxine sind unter anderem für die redoxabhängige Regulation des Calvin-Zyklus verantwortlich (Yoshida *et al.*, 2019). So wird die Aktivität des Schlüsselenzyms PRK direkt durch ein Ferredoxin-Thioredoxin-System reguliert (Graciet *et al.*, 2004). Thioredoxin ist dabei an der Aktivierung von Schlüsselproteinen beteiligt. Für eine effektive Regulierung, angepasst auch an die Lichtbedingungen, ist eine oxidative Inaktivierung der Schlüsselproteine aber genauso entscheidend. Neuere Untersuchungen legen eine Funktion von *abundant 2-cysteine peroxiredoxin* (2-CysPrx) als Thioredoxin-Oxidase und damit für die Inaktivierung der Thioredoxin-abhängigen Zielproteine nahe (Vaseghi *et al.*, 2018). Die Thioredoxin-abhängige Aktivierung und Deaktivierung ist an der Kontrolle von vielen Stoffwechselwegen beteiligt, neben dem erwähnten Calvinzyklus zählen auch die Stärkeakkumulation, das *non-photochemical quenching* und das Malatventil dazu. Zusammengenommen mit den S-Nitrosylierungen wurden in der DIGE-Analyse also mehrheitlich Proteine identifiziert, für die ein Zusammenhang mit redoxsensitiven Systemen postuliert wird. Ob und inwieweit diese Systeme für die gefundene Regulation der Proteinspots von Bedeutung sind, bleibt fraglich. Die Identifikation von Modifikationen wie *peptidyl-cysteine S-nitrosylations* oder der Oxidationszustand von Disulfidbrücken ist nicht trivial und mit den verwendeten Methoden nicht möglich. Diese Strukturen wurden entweder durch DTT aufgelöst oder können während der Massenspektrometrie verloren gehen.

Ein klarer physiologischer Reiz, welcher zu der beobachteten Regulation führen könnte, wurde hingegen nicht gefunden. Saccharose bedingt beispielsweise die Induktion der GLN2 (Oliveira und Coruzzi, 1999), wirkt sich jedoch negativ auf die Expression von Proteinen des Calvinzyklus aus, wie z.B. der PRK (Marri *et al.*, 2005). Nur für wenige der gefundenen Proteine ist eine circadiane Regulation gezeigt worden (der verkürzte *Arabidopsis*-RCA-Promotor in Tabak (Liu *et al.*, 1996), PRK in *Chlamydomonas reinhardtii* (Lemaire *et al.*, 1999)) und auch die Betrachtung von Microarray-Daten zeigte besonders in adulten Pflanzen kein eindeutig diurnales Expressionsmuster für die hier gefundenen Proteine (NASCARRAYS-493 von James *et al.* (2008)).

Für einige der gefundenen Proteine sind kommerzielle Antikörper verfügbar. Mit Hilfe dieser konnte der regulatorische Einfluss auf fünf der gefundenen Proteine auch mittels *Western blot*

nachgewiesen werden. Untersucht wurden ebenfalls Chloroplastenextrakte identisch angezogener Pflanzen. Neben der *cry3*-Mutante wurde auch die *cry3*-GFP exprimierenden Pflanzen (*Ler*-Hintergrund) und drei *cry3*-HA-Linien (*cry3*-Mutantenhintergrund) untersucht. Für *cry3*-GFP war ähnlich wie auch für die *cry3ox*-Linie (hierbei wird *cry3* unter Kontrolle des 35S Promotors in *Ler* exprimiert) kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp zu detektieren. Anders für die *cry3*-HA Linien im Mutantenhintergrund, diese verhielten sich identisch zu *cry3*. Folglich konnte die Expression des mit HA-tag fusionierten *cry3* den Mutantenphänotyp nicht komplementieren.

Auch eine eindeutige Lichtabhängigkeit des beobachteten Phänotyps konnte nicht nachgewiesen werden. Um eine Lichtabhängigkeit von einem diurnalen Effekt abzugrenzen, wurde mit dunkeladaptierten Pflanzen gearbeitet. Die relative Proteinmenge von RA1, RA2 und Pap1 wurde dafür in Gesamtextrakten dunkeladaptierter Pflanzen bestimmt, die ins Licht überführt oder im Dunkeln belassen wurden. Die Probennahme erfolgte über einen Zeitraum von 8 Stunden. Weder bei einer Normierung der relativen Proteinmenge gegen den Chlorophyllgehalt (als Maß für die Chloroplastendichte) noch gegen den Gesamtproteingehalt zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Auch ein Effekt der Belichtung auf die relative Menge an RA1, RA2 und Pap1 konnte nicht festgestellt werden.

Möglicherweise spielt das Bezugssystem eine entscheidende Rolle und die geringen Unterschiede in der Proteinabundanz treten nur in Organellen-Extrakten stark genug zu Tage. Auch eine Rolle der diurnale Rhythmik für den festgestellten Phänotyp wäre vorstellbar. Aber auch in Gesamtextrakten aus Blattmaterial, das parallel zu den Chloroplastenextrakten geerntet wurde, zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Ein anderer Erklärungsansatz für diese Beobachtung würde die Beteiligung von *cry3* am Proteinimport in die Chloroplasten postulieren. Auch die Degradation der Proteine findet nicht ausschließlich in Chloroplasten statt, zumindest einige Proteine werden dafür aus den Chloroplasten exportiert (Lee *et al.*, 2013). Die Betrachtung der Chloroplastenextrakte stellt damit ein besseres System da, um auf die Menge an biologisch aktiven Chloroplastenproteinen zu schließen.

Auch wenn die gesammelten Daten auf eine Funktion von *cry3* als Photorezeptor hindeuten, reichen sie nicht aus, um eine eindeutige biologische Funktion abzuleiten. Eine Beteiligung an der Feinregulation der Funktionalität oder Stabilität von Chloroplastenproteinen in einem diurnalen oder lichtabhängigen Zusammenhang wäre vorstellbar.

Die hier gezeigten Daten legen eine Funktion abseits der Proteinexpression nahe, während Daten von Sarina Nebel auch für einen transienten Einfluss von *cry3* auf die Expression kernkodierter Chloroplastenproteine sprechen. Sie untersuchte mittels qRT-PCR die mRNA-Mengen ausgewählter Chloroplastenproteine während der Deetiolierung von Keimlingen der *cry3*-Mutante und des

Wildtyps (Nebel, 2012). Möglicherweise wirkt *cry3* in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien auf variable Weise. Während der Deetiolierung enthalten die Pflanzenzellen noch keine funktionellen Chloroplasten, die Proplastiden müssen zunächst reifen bevor die Photosynthese anlaufen kann. Zu dem Zeitpunkt, an dem eine deutliche Ergrünung der etiolierten Keimlinge zu beobachten war, zeigte *cry3* schon keinen Einfluss mehr auf die Transkriptmengen. Vorschläge zu der Art und Weise in der *cry3* diese unterschiedlichen regulatorischen Aufgaben erfüllen könnte, sind zum jetzigen Zeitpunkt rein spekulativ.

4.4 Interaktionspartner von *cry3*

Weiteren Aufschluss über den Mechanismus mit dem *cry3* regulatorisch auf das Chloroplastenproteom wirkt, könnte die Identifikation von Interaktionspartnern liefern. Hierfür wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen gewählt: zum einen die Co-IP mit massenspektrometrischer Proteinbestimmung und zum anderen ein Y2H *library screen*. Die erste Variante bietet den Vorteil, dass die Untersuchung mit Extrakten des tatsächlichen Organismus stattfindet. Falsch positive Ergebnisse sind bei guter Datenauswertung und entsprechenden Kontrollen relativ selten. Dafür ist die Wahrscheinlichkeit höher eine Interaktion nicht zu detektieren, weil beispielsweise die Pufferbedingungen für die Interaktion nicht ideal sind, oder die Proteinmenge des Interaktionspartners schlicht unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Im Y2H-*library-screen* findet die Interaktion in der lebenden Zelle statt, auch schwache Interaktionen und solche mit sonst seltenen Interaktionspartnern können durch die artifizielle Expression nachgewiesen werden. Allerdings findet die Analyse im Zellkern von Hefezellen statt. Gerade Membranproteine werden hier möglicherweise nicht richtig gefaltet, pH-Wert und andere Parameter sind möglicherweise nicht ideal und eine Interaktion für die mehr als zwei Partner benötigt werden, kann nicht beobachtet werden. Zudem enthalten die Bibliotheken oft nur Fragmente der proteinkodierenden Sequenzen. So wird nicht das komplette Protein exprimiert.

Dennoch sind sowohl die Co-IP mit anschließender LC-ESI-MS als auch der Y2H *library screen* sinnvolle und erfolgsversprechende Methoden, um unbekannte Interaktionspartner eines Zielproteins zu identifizieren.

4.4.1 Mittels CoIP kann kein eindeutiger Interaktionspartner von *cry3*-HA und *cry3*-GFP in Chloroplastenextrakten identifiziert werden

Für die CoIP wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen verwendet, die *cry3*-HA bzw. *cry3*-GFP exprimieren. Zur Immunopräzipitation wurden Antikörper gegen die Fusionsproteine verwendet, im Falle von HA wurde dieser mit *Dynabeads*[®] gekoppelt (2.4.9.2). Für die GFP-Fusion wurde *GFP*-

Trap[®]_M verwendet, das bereits in 2.4.9 und 3.4.1 genauer beschrieben wurde. Mit beiden Ansätzen war es nicht möglich das Fusionsprotein durch eine pH-Verschiebung ins Saure quantitativ zu eluieren und auch eine Verschiebung des pH-Werts ins Basische lieferte kein zufriedenstellendes Ergebnis. Ein mit Silber gefärbtes Gel mit Eluat einer cry3-GFP-CoIP zeigte, dass zahlreiche Proteinbanden erst nach Elution mit SDS-Probenpuffer von den *beads* separiert wurden. Nur einige spezifische Banden sind im Eluat durch eine pH-Verschiebung sichtbar (Abbildung 3.16). Eine mögliche Erklärung wäre, dass zu viel CoIP-Puffer im Reaktionsgefäß verblieb und der pH-Wert dadurch nicht ausreichend verändert wurde. Dagegen spricht aber, dass auch eine sequentielle Elution, bei der dreimal mit *low pH buffer* eluiert wurde keine Verbesserung der Elution zeigte. Zudem färbte sich der pH sensitive Farbstoff Bromphenolblau der im Ladepuffer enthalten ist, gelb, was einen pH-Wert unter 3 anzeigt. In einem so niedrigen pH-Bereich sollte die Antikörper-Antigen-Bindung nicht bestehen bleiben. Wahrscheinlicher erscheint eine Präzipitation des Zielproteins und Aggregation mit den *beads* oder Anhaften an das Reaktionsgefäß. Eine Möglichkeit, diesen Effekt zu minimieren, wäre das Verwenden von Detergenzien. Diese sind allerdings mit den nachfolgend durchzuführenden massenspektrometrischen Untersuchungen nicht kompatibel. Über die Verwendung von Konzentratoren können Detergenzien zu einem gewissen Teil entfernt werden, doch birgt auch dies stets das Risiko, dass es hierbei zur Präzipitation von Proteinen an der Membran kommt. Eine Verwendung von sanfteren Detergenzien stellt daher, im Hinblick auf die folgende Massenspektrometrie, keinen Vorteil gegenüber dem Aufkochen in SDS-Probenpuffer dar. Vor der Massenspektrometrie wurden die Proben über ein Acrylamidgel separiert. Ein ähnliches Vorgehen ist zum Beispiel von Free *et al.* beschrieben (Free *et al.*, 2009), im Fall von cry3-HA wurden auch sauer eluierte Proben analysiert, die über einen Konzentrator (Vivaspin 500 *centrifugal concentrators* MWCO 10 kDA, Sigma-Aldrich) gereinigt wurden.

Ein markanter Unterschied, der sich bei der Wahl der Fusion zeigt, scheint die Spezifität zu sein. Nach einer CoIP mit cry3-HA zeigte sich im mit Silber oder kolloidalem Coomassie gefärbten Polyacrylamid-Gel hauptsächlich eine einzige Bande für cry3-HA. Die Kontrollspur, bei der Extrakte aus der cry3-Mutante in die CoIP eingesetzt wurden, war annähernd leer. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Massenspektrometrie wieder. Neben sehr deutlichen Signalen für cry3 (siehe auch Abbildung 6.6 und Abbildung 6.7) konnten nur wenige Peptide identifiziert und Proteinen zugeordnet werden. Leider war keines der gefundenen Proteine spezifisch für die CoIP mit cry3-HA, sondern tauchte auch in den Kontrollen (CoIP mit Extrakten der *cry3* Mutante) auf.

Die CoIPs mit cry3-GFP und den entsprechenden *GFP-Trap[®]_M* zeigten wesentlich mehr Banden im gefärbten Polyacrylamid-Gel, allerdings nicht nur für die Probe, sondern auch für die Kontrollen *Ler*- und die *cry3*-Mutante (siehe Abbildung 3.17). Insgesamt zeigt ein Vergleich, dass im Verhältnis

mehr cry3-GFP als cry3-HA eluiert werden konnte. In der Massenspektrometrie wurden Peptide für insgesamt 8 Proteine gefunden, die nur in der cry3-GFP-Probe und in keiner der Kontrollen auftauchten. Dabei handelt es sich allerdings um 1 bis 2 Peptide pro Protein. Das ist eine sehr schlechte Abdeckung und lässt auf eine sehr geringe Abundanz der jeweiligen Proteine in der Probe schließen. Zudem waren diese Treffer nicht reproduzierbar, keines der Peptide war in allen drei Proben zu finden.

Obwohl die CoIP auf Basis der Menge an eluiertem Protein und insgesamt geringem Hintergrund anderer Proteine zufriedenstellend funktionierte, war es nicht möglich einen Interaktionspartner von cry3 zu identifizieren. Neben der Suche nach einem neuen Partner wurde auch überprüft, ob die Chloroplastenproteine, die in der cry3-Mutante differentiell exprimiert wurden (siehe 3.3.2.1) und gegen die Antikörper verfügbar waren (RCA, PRK, GLN2, Pap1) spezifisch mit cry3-GFP oder cry3-HA interagierten. Unter den gewählten Bedingungen konnte jedoch keine Interaktion gefunden werden.

Ein sehr überraschendes Ergebnis wird in Abbildung 3.17 d deutlich. Wenn statt Chloroplastenextrakten Gesamtextrakte eingesetzt werden, ist die Effizienz der CoIP deutlich höher, die vielfache Menge cry3-GFP kann aus den Gesamtextrakten eluiert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass eine höhere Gesamtproteinkonzentration und niedrigere relative Konzentration von cry3-GFP die Verluste über das Anhaften an verwendete Plastikgefäße und Pipettenspitzen verringern könnte. Doch auch wenn mit Hilfe von BSA die Proteinkonzentration der Chloroplastenextrakte angepasst wurde, zeigte sich keine verbesserte Wiederfindungsrate von cry3. Auch wurden spezielle *protein low binding tubes* von Eppendorf eingesetzt, da sich bereits im Vorfeld zeigte, dass dies die Effizienz der CoIP verbesserte. Möglicherweise wirkt sich das komplexere Proteingemisch in den Gesamtextrakten anders aus als die bloße Substitution durch ein einzelnes Protein. Die Aktivität von Proteasen wurde durch die Verwendung eines Inhibitor Cocktails in beiden Extrakten unterdrückt, auch Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen, mit und ohne Protease Inhibitoren (*complete Mini*, *EDTA-free* Protease Inhibitoren (Roche, Mannheim)) zeigte kaum einen Einfluss auf die Effizienz der CoIP. Die Proteaseaktivität schien in keinem Ansatz besonders hoch und weder in den Gelen noch auf den *Western blots* waren Anzeichen für eine nennenswerte Proteindegradation zu erkennen.

Spekulativ, jedoch vorstellbar wäre, dass cry3-GFP in Chloroplasten nicht komplett identisch mit dem cry3-GFP in anderen Zellkompartimenten ist. Posttranslationelle Modifikationen könnten die physikalischen Eigenschaften des Proteins verändern. Anhand der massenspektrometrisch identifizierten Peptide lässt sich dafür zwar kein Hinweis finden, doch gehen durch die Probenprozessierung zahlreiche Modifikationen verloren. Auch Phosphorylierungen konnten durch

die Verwendung von Phos-tagTM (Wako Chemicals GmbH, Neuss) nicht nachgewiesen werden. Weitere Anhaltspunkte könnte die Untersuchung auf einem 2D-Gel liefern. Analysiert werden könnten entweder die Eluate der CoIP oder Gesamt- und Chloroplastenextrakte bei denen die Elektrophorese von einem *Western blot* und der Detektion mit Anti-GFP-Antikörpern gefolgt werden könnte.

Die Gründe warum in der CoIP keine neuen Identifikationspartner identifiziert wurden, können vielfältig sein. Die falschen Pufferbedingungen, der Einbau von cry3-HA bzw. cry3-GFP in einen großen Komplex, der die Fusion unzugänglich macht, die falschen Lichtbedingungen, falsche Uhrzeit der Probennahme oder generell ungeeignetes physiologisches Stadium der Pflanzen sind nur einige der möglichen Ansatzpunkte.

4.4.2 Im *yeast two hybrid library screen* interagiert cry3 spezifisch mit zwei Proteinen

Mit Hilfe des durchgeführten *Y2H library screens* war es möglich, zwei Proteine zu identifizieren, die als potenzielle Interaktionspartner von cry3 angesehen werden können: DPE2 und NUP205. In dem *library screen* wurden zunächst 9 mögliche Interaktionspartner identifiziert, wobei einer nicht korrekt translatiert wurde und somit keinem realen *Arabidopsis* Protein entspricht. Eine biologisch relevante Interaktion kann für die anderen potentiellen Interaktionspartner nicht ausgeschlossen werden. Doch erscheint diese zumindest im Fall von MYB3, COR78, LEUD1, ATJ1 und COL4 unwahrscheinlich, da hier die Hefekolonien ein sehr gutes Wachstum auf Selektionsmedium (-LWAH siehe 2.3.7.2) zeigten, welches vollkommen unabhängig von cry3 ist. Für MYB3 und COL4 ist diese beobachtete Selbstaktivierung der GAL4 regulierten Gene nicht überraschend, da es sich bei diesen Proteinen um Transkriptionsfaktoren handelt, die somit in der Lage sein können die fusionierte AD an die DNA zu rekrutieren. Ebenso wie die beiden Transkriptionsfaktoren trägt zwar auch das Chaperon ATJ1 eine Zinkfingerdomäne, doch ist diese an der Bindung von Peptiden und nicht von DNA beteiligt. Eher überraschend ist die beobachtete Selbstaktivierung auch für die Aconitase LEUD1 sowie für das kurze Peptid, welches durch die Translation der falsch inserierten COR78 cDNA entsteht.

Unerwartet ist, dass CAT3 und GluRS eine Selbstaktivierung zeigen, obwohl sie in vergleichbaren Y2H Screens in AH109 bereits verwendet wurden. Dabei wurde CAT3 aus einer pGADT7 *library* als Interaktionspartner von HL2b identifiziert (Inaba *et al.*, 2011), während GluRS in einem vergleichbaren Screen als *bait* eingesetzt wurde und folglich an die BD fusioniert war (Brandão *et al.*, 2009). Während für CAT3 der Test auf Selbstaktivierung nicht gezeigt ist, scheint GluRS-BD tatsächlich zu keiner Expression der Reportergene zu führen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch zu erwähnen, dass AD-MYB3 in dem Hefestamm PJ69-4A ebenfalls nicht

selbstaktivierend ist und dort über einen *library* Screen als Interaktionspartner von CPL1 identifiziert werden konnte (Bang *et al.*, 2008).

Besonders im Falle von GluRS, bei dem die Selbstaktivierung relativ schwach war, könnte es Sinn machen, die Stärke der Aktivierung über ein X-Gal Assay zu überprüfen. Dafür würde sich zum Beispiel der Hefestamm Y187 anbieten, da dieser zu einer guten Expression von *lacZ* führt während diese in AH109 auch bei starken Interaktionen sehr schwach ist. Ein anderer Ansatz wäre die Interaktion von BD-GluRS und AD-CRY3 zu untersuchen, da der Tausch der Domänen eine Selbstaktivierung unterbinden kann.

Die Stärke der Interaktion unter verschiedenen Bedingungen über ein X-Gal Assay zu untersuchen, könnte sich auch für DPE2 und NUP205 als aufschlussreich erweisen, da so z. B. getestet werden könnte, ob die Interaktion von unterschiedlichen Lichtbedingungen abhängig ist. Das Wachstum von AH109 mit BD-CRY3 und AD-DPE2 bzw. AD-NUP205 wurde zwar bereits unter $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ Blaulicht und Dunkelheit beobachtet (wobei sich kein nennenswerter Unterschied zeigte, Daten nicht gezeigt) doch wenn die Interaktion nicht nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ abläuft, kann es sein, dass ein möglicher Effekt erst in einem sensitiveren Assay sichtbar wird.

In dem verwendeten Hefesystem kann die Interaktion auch durch eine CoIP überprüft werden. AD-CRY3 kann über den ebenfalls enthaltenen c-Myc-tag präzipitiert werden. Die Detektion der Konstrukte in den library Plasmiden kann über die Verwendung von Antikörpern gegen die Aktivierungsdomäne erfolgen. Alternativ wäre auch eine Klonierung der *library inserts* in den Vektor pGADT7 vorstellbar, der zur Fusion eines HA-tags führt und daher auch die Verwendung dieser sehr spezifischen Antikörper ermöglichen würde. Das Testen von unterschiedlichen Licht- und Pufferbedingungen wäre hier sinnvoll. Während eine gefundene Interaktion in der CoIP recht sicher für eine Interaktion der potentiellen Partner sprechen würde, müsste ein negatives Ergebnis umgekehrt nicht bedeuten, dass *in vivo* keine Interaktion stattfindet. Durch den Versuchsablauf können schwache Interaktionen verloren gehen, während die Wahl geeigneter Puffer und Inkubationsbedingungen für eine Interaktion entscheidend sind. Da bei CoIPs eine Bindung an die DNA und eine so ausgelöste Selbstaktivierung im *Y2H screen* aber von untergeordneter Bedeutung ist, könnten damit auch die selbstaktivierenden Kandidaten untersucht werden.

Wünschenswert wäre es, eine Interaktion in Pflanzenzellen zeigen zu können, wofür sich z.B. fluoreszenzbasierte Systeme wie *FRET-FLIM* oder *Split YFP* in *Arabidopsis* oder Tabak anbieten würden. Eine Transformation der Pflanzen könnte dabei über Agrobakterien stattfinden und die Lokalisation sowie Interaktion mit cry3 könnte weiter untersucht werden. Die Verwendung von verkürzten Versionen wie sie in den *library*-Plasmiden enthalten waren, könnte dabei eine falsche Lokalisation innerhalb der Pflanzenzelle nach sich ziehen. In den *library* Plasmiden waren nicht die

kompletten cDNAs der entsprechenden Proteine enthalten. Welche Bereiche tatsächlich exprimiert wurden, ist anhand von Proteinalignments in Anhang Abbildung 6.9 dargestellt.

4.4.2.1 Über eine Interaktion mit DPE2 könnte cry3 den Zuckerstoffwechsel der Pflanze modulieren

Im Falle von DPE2 handelt es sich um ein knapp 110 kDa großes Enzym, welches hauptsächlich im Cytoplasma vorkommt und eine essenzielle Komponente des Abbaus von Stärke zu Saccharose darstellt, im Cytoplasma metabolisiert es dabei die aus dem Chloroplasten exportierte Maltose. In dem *library*-Plasmid enthalten sind etwa die ersten 500 der insgesamt 955 Aminosäuren, also ungefähr die N-terminale Hälfte des Proteins.

Der nächtliche Abbau von Stärke ist für Pflanzen ein essenzieller Mechanismus, um optimales Wachstum in der Nacht zu gewährleisten. Die am Tag angelegten Energievorräte werden dabei während der Dunkelphase in der wachsenden Pflanze nahezu komplett aufgebraucht. Beim Abbau der Stärke wird diese mit Hilfe von DPE2 weiter umgesetzt und in Hexosephosphat bzw. Saccharose umgewandelt. Eine Besonderheit der pflanzlichen Glucanotransferase ist dabei, dass im Unterschied zu den bakteriellen Vorfahren lösliche Heteroglucane glycosylieren. Das Produkt der enzymatischen Umsetzung von Maltose durch DPE2 ist folglich Glucose und ein glucosyliertes Heteroglycan, welches durch weitere Phosphorylierung zu Glucosephosphat umgesetzt wird. Die Bedeutung dieses Stoffwechselwegs ist leider weitgehend unbekannt (Ruzanski *et al.*, 2013).

Die gebildeten Zuckermoleküle sind für die Pflanzenzelle als Energiequelle essenziell. Kohlenhydrate werden in der Pflanze hauptsächlich in Form von Saccharose transportiert und somit von den photosynthetisch aktiven, grünen Pflanzenteilen in die verbrauchenden Organe geleitet. Die Menge an bereitgestellter Saccharose muss genau abgestimmt werden, um einerseits ein optimales Wachstum sicher zu stellen und andererseits genug Stärke zurück zu halten, um die Nacht zu überdauern. Dabei kommt Zuckern auch eine Funktion als Signalmolekül zu (Tognetti *et al.*, 2013). Neben Hexosen sind auch Saccharose und Trehalose bzw. Trehalose 6-Phosphat als Signalmolekül bekannt. In Bezug auf die Letztgenannten wurde das *nexus* Modelle entwickelt, demnach sei die Hauptfunktion von Trehalose 6-Phosphat das Saccharose Level in der Pflanze zu kontrollieren, Trehalose 6-Phosphat ist dabei nicht nur ein Signal, sondern auch negativer Rückkopplungs-Regulator für die Saccharose Menge (Figueroa und Lunn, 2016). Neben der Homöostase von Nährstoffen in der Pflanze, ist das Zucker-*signaling* auch an der Steuerung von Entwicklungsprozessen und der Stressantwort beteiligt. Die genauen Signaltransduktionswege sind komplex und laufen über Signalintegratoren. Diese Signalintegratoren könnten das Gleichgewicht zwischen anabolischen und katabolischen Prozessen, sowie Speicherung und Abbau von Reserven

über epigenetische Reprogrammierung, transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation, die Ribosomen Biogenese, translationelle Aktivität, sowie Protein Modifikationen steuern. Die bisher bekannten Signaltransduktionswege sind dabei außerdem eng mit den Hormon- und Nitrat-Signaltransduktionswegen verknüpft (Sakr *et al.*, 2018).

Die Untersuchung des Chloroplastenproteoms mittels 2D-DIGE ergab die differentielle Expression einer Reihe von Chloroplastenproteinen in der *cry3*-Mutante, darunter direkte oder indirekte Komponenten des Calvin Zyklus (PGK1, PRK) und der Photorespiration bzw. des Stickstoffzyklus (GLN2). Das sind Stoffwechselwege, die durch Saccharose beeinflusst werden. Auch wenn nicht in allen Fällen ganz klar ist, inwieweit es sich dabei um eine Funktion des Zuckers als Signalmolekül oder eher ein negatives Feedback handelt, wie zum Beispiel bei der Saccharose-abhängigen Inhibierung der CO₂ Fixierung. Eine direkte Regulation über Saccharose ist für das im 2D-DIGE differenziell exprimierte Protein GLN2 bekannt (Oliveira und Coruzzi, 1999). Weitere Proteine deren Abundanz in der Untersuchung des Chloroplastenproteoms durch das Fehlen von *cry3* beeinflusst waren und die mehr oder weniger direkt am Stärkemetabolismus beteiligt sind, sind PRK, PGK1 und die RA1 und RA2. Die PRK und PGK1 sind Enzyme des Calvinzyklus und die RA steigert die Aktivität des Schlüsselenzyms RuBisCO indem es den gebundenen Zucker aus der katalytischen Tasche entfernt. Während freie Saccharose die Expression der GLN2 induziert, hemmt sie die von PRK (Marri *et al.*, 2005; Oliveira und Coruzzi, 1999) und möglicherweise anderer Enzyme der Kohlenhydratsynthese. Eine Interaktion von *cry3* und DPE2 hat zwar das Potenzial, ein Lichtsignal über das Signalmolekül Saccharose in einen physiologischen Reiz zu übersetzen, doch lassen die in Bezug auf dieses Signalmolekül widersprüchlichen Daten der 2D-DIGE daran zweifeln, bzw. nicht auf einen einfachen Zusammenhang schließen.

Gegen die Überlegung, dass *cry3* Einfluss auf den Stärkestoffwechsel und damit potentiell auch auf Saccharose als Signalmolekül nimmt, spricht auch eine Untersuchung des Stärkegehalts in Blättern des Wildtyps und der *cry3*-Mutante am Anfang und Ende des subjektiven Tags. Auch wenn der Probenumfang für verlässliche Daten nicht ausreichte, zeigte sich nur in sehr alten Pflanzen ein Einfluss von *cry3* auf den Stärkegehalt. Diese Pflanzen wiesen schon Seneszenzerscheinungen auf und die Stärkemenge blieb unabhängig von der Tageszeit sehr konstant, wohingegen in jüngeren Pflanzen ein deutlicher Stärkeabbau über Nacht und eine Akkumulation über den Tag zu messen war. Ein Einfluss der Genotypen auf die Stärkemenge der jüngeren Pflanzen war allerdings nicht zu beobachten (Göbel, 2011). Neben *cry3* sind in den untersuchten Pflanzen natürlich weitere Photorezeptoren aktiv und die gesamte Regulation von Photosynthese und Calvinzyklus, sowie der abbauenden Stoffwechselwege sind komplex. Die direkte oder indirekte Regulation der Genexpression über Photorezeptoren, Phytohormone wie Auxin, Zucker und auch Redoxsignale sind daran beteiligt. Über den Photozyklus von FAD wäre sogar eine Beteiligung von *cry3* an der

Entstehung oder der Verarbeitung von Redoxsignalen vorstellbar. Eine Modulation der Aktivität von DPE2 über cry3 sollte daher keinesfalls ausgeschlossen werden und würde ein interessantes System der Signalweiterleitung darstellen.

4.4.2.2 NUP205 ist Teil des *nuclear pore complex* und potenzieller Interaktionspartner von cry3

Das zweite im Y2H nicht selbstaktivierende Protein NUP205 ist Bestandteil des *nuclear pore complex* und mit 206 kDa recht groß. Von den insgesamt 1838 kodierten Aminosäuren finden sich knapp 530 in dem *library*-Plasmid, welche ungefähr im zweiten Viertel des Proteins liegen. Sowohl N- als auch C-Terminus von NUP205 sind in dem getesteten Plasmid also nicht enthalten. Auch muss angemerkt werden, dass es einige Unterschiede in der Aminosäuresequenz des Inserts und der in den Datenbanken hinterlegten Sequenz für NUP205 gibt (siehe Abbildung 6.9). Dabei handelt es sich um 9 zusätzliche Aminosäuren relativ am Anfang und 19 etwa in der Mitte des Inserts. Diese Aminosäuren tauchen nicht in den bekannten Sequenzen, wie sie auf Datenbanken hinterlegt sind, auf. Möglicherweise könnte es sich dabei um abweichende Splicevarianten handeln oder einfach um Unterschiede zwischen dem für die *library* verwendeten Ökotyp Nossen und dem sequenzierten Ökotyp Columbia.

Der Aufbau der Kernpore (*nuclear pore complex* (NPC)) in *Arabidopsis* ähnelt dem von Vertebraten stark. Tamura *et al.* identifizierten zahlreiche Komponenten des NPCs in *Arabidopsis* und benannten sie nach ihren Homologen im Mensch (Tamura *et al.*, 2010). Bei dem gefundenen potenziellen Interaktionspartner von cry3 handelt es sich um ein Protein der inneren Kernpore oder genauer des NUP93-Subkomplexes. Das Fusionsprotein NUP205-GFP lokalisiert spezifisch in der Kernhülle, dies wurde mit einem KLSM in Wurzelzellen von stabil transformierten Arabidopsis-Linien untersucht. Dies ist auch insofern interessant da es zeigt, dass die Fusion die Lokalisation von NUP205 nicht zu stören scheint, was eine Untersuchung der Interaktion mit cry3 mittels Split-YFP oder anderen fluoreszenzbasierten Methoden ermöglichen würde.

In einer älteren Untersuchung des Chloroplastenproteoms wurde NUP205 massenspektrometrisch auch in Chloroplastenextrakten identifiziert (Kleffmann *et al.*, 2004). Weitere Hinweise auf diese Lokalisation oder die Funktion des Proteins dort gibt es aber nicht und es ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um eine Verunreinigung der Extrakte handelte.

Die NPCs sind mit über 50 Mega-Dalton große Proteinkomplexe mit einer Achtersymmetrie, die eine donutartige Struktur bilden (Fiserova *et al.*, 2009; Tamura und Hara-Nishimura, 2013). Neben der Aufgabe, den Import und Export von Proteinen und RNAs in und aus dem Zellkern zu regeln, scheint Teilen des NPCs auch eine direkte Funktion bei der Regulation der Genexpression

zuzukommen. NUP205 ist wie erwähnt Teil des NUP93-Subkomplexes, der mit menschlichen Chromosomen und den Promotoren der HOXA-Genen interagiert. An der Unterdrückung der Expression der HOXA-Gene sind dabei auch NUP188 und NUP205 beteiligt (Labade *et al.*, 2016). Die Funktion von NUP205 in Pflanzenzellen ist weniger gut untersucht; auf Grund der großen Ähnlichkeit zu Vertebraten ist aber eine analoge Funktion wahrscheinlich. Eine Interaktion mit cry3 könnte Teil des Imports von cry3 in den Zellkern sein oder weitreichende regulatorische Folgen haben. Ein durch cry3 perzipierte Lichtsignal könnte über die Interaktion mit NUP205 die Expression von kernkodierten Genen modulieren. Ein transienter Einfluss von cry3 auf die Transkription spezifischer Gene wurde bereits 2012 von Sarina Nebel vorgeschlagen. Für cry3 wurde dabei eine mögliche Funktion als Repressor der blaulichtabhängigen Induktion von kern- und plastidenkodierten Chloroplastenproteinen während der Deetiolierung von Keimlingen gefunden. Wie genau die Art der Signalweiterleitung aussieht, ist spekulativ. Die Fähigkeit von cry3, einzelsträngige DNA zu binden, könnte aber in der Transkriptionsblase zum Tragen kommen. Ebenfalls vorstellbar wäre die Interaktion mit den gebildeten mRNAs, auch eine Beteiligung am Export dieser aus dem Zellkern. Vergleicht man die subzelluläre Lokalisation von cry3-GFP mit der von NUP205-GFP ist die Interaktion im Bereich der Kernhülle durchaus plausibel. Denn neben der Lokalisation in den Organellen zeigt sich auch eine starke Anreicherung von cry3 im Zellkern und speziell dem Nukleolus, also dem Ort an dem die Biosynthese der ribosomale RNA erfolgt.

5 Zusammenfassung

Cry3 aus *Arabidopsis thaliana* ist eines der ersten identifizierten DASH Cryptochrome (Kleine *et al.*, 2003). Trotzdem war die biologische Funktion von cry3 bisher weitgehend unbekannt und die Frage, ob es sich um einen Photorezeptor handelt, offen. Die meisten verfügbaren Daten basieren auf heterolog exprimiertem cry3. Die immunologische Präzipitation von *in planta* exprimiertem cry3-GFP ermöglichte es, die Cofaktoren fluorimetrisch zu charakterisieren und als MTHF und FAD zu bestätigen. Somit scheint das in *E. coli* exprimierte und mit *His-tag* fusionierte cry3 ein valider Stellvertreter für das in der Pflanze synthetisierte Protein zu sein und die gewonnenen *in vitro* Daten auf die Situation *in planta* übertragbar.

Um weitere Anhaltspunkte über die biologische Funktion zu erhalten, wurde die Expression und Lokalisation von cry3 untersucht. Die relative Transkriptmenge von *CRY3* wird durch alle getesteten Lichtqualitäten transient erhöht, mit einem Maximum etwa zwei Stunden nach Einsetzen der Belichtung. An der Regulation der Transkriptmenge von *CRY3* ist neben cry1, cry2 und UVR8 besonders phyA maßgeblich beteiligt, auch unter Rotlicht.

Untersuchungen einer cry3-Deletions-Mutante ergaben einen geringen aber reproduzierbaren Einfluss auf die Inhibierung der Hypokotylelongation während der Deetiolierung von Keimlingen. Die Keimlinge der cry3-Mutante reagierten dabei schwächer auf Blaulicht. Eine Komplementation der Mutante scheiterte zwar, doch auch das Chloroplastenproteom der cry3-Mutante zeigte in einer 2D-DIGE Analyse Unterschiede zum Wildtyp. Western Blots konnten dieses Ergebnis untermauern, wenn auch der Unterschied zwischen Wildtyp und cry3 Mutante nur in Chloroplastenextrakten und nicht in Gesamtextrakten ersichtlich war. Zusammengenommen sprechen die Phänotypen der cry3-Mutante für eine Funktion von cry3 als Photorezeptor.

Während zunächst angenommen wurde, dass cry3 hauptsächlich in Chloroplasten und Mitochondrien vorkommt, konnte cry3-GFP hier auch im Zellkern (und dabei speziell dem Nukleolus) gefunden werden und liegt somit in allen DNA enthaltenden Kompartimenten vor. Dies ist besonders interessant da cry3 *in vitro* einzelsträngige DNA und RNA binden kann (Pokorny *et al.*, 2008). In Chloroplasten konnte cry3 hauptsächlich als lösliches Protein im Stroma gefunden werden. Das Elutionsverhalten in einer SEC deutet zudem darauf hin,

dass cry3 an einen großen, löslichen Komplex assoziiert ist. Eine genaue Identifizierung dieses Komplexes steht aus. Über eine CoIP mit Chloroplastenextrakten wurde versucht, mögliche Interaktionspartner von cry3-HA und cry3-GFP zu finden. Die massenspektrometrische Analyse der Eluate führte jedoch zu keinen eindeutigen Befunden. In einem Y2H library screen wurde eine cDNA-Bibliothek überprüft und zwei spezifische Interaktionspartner gefunden. Bei den Kandidaten handelt es sich um NUP205, ein Kernporenprotein und DPE2, ein cytosolisches Protein des Stärkemetabolismus. Weitere Untersuchungen müssen die Y2H Daten verifizieren und zeigen in wieweit diese Protein an einer biologischen Funktion von cry3 beteiligt sind.

6 Anhang

6.1 Abbildungen

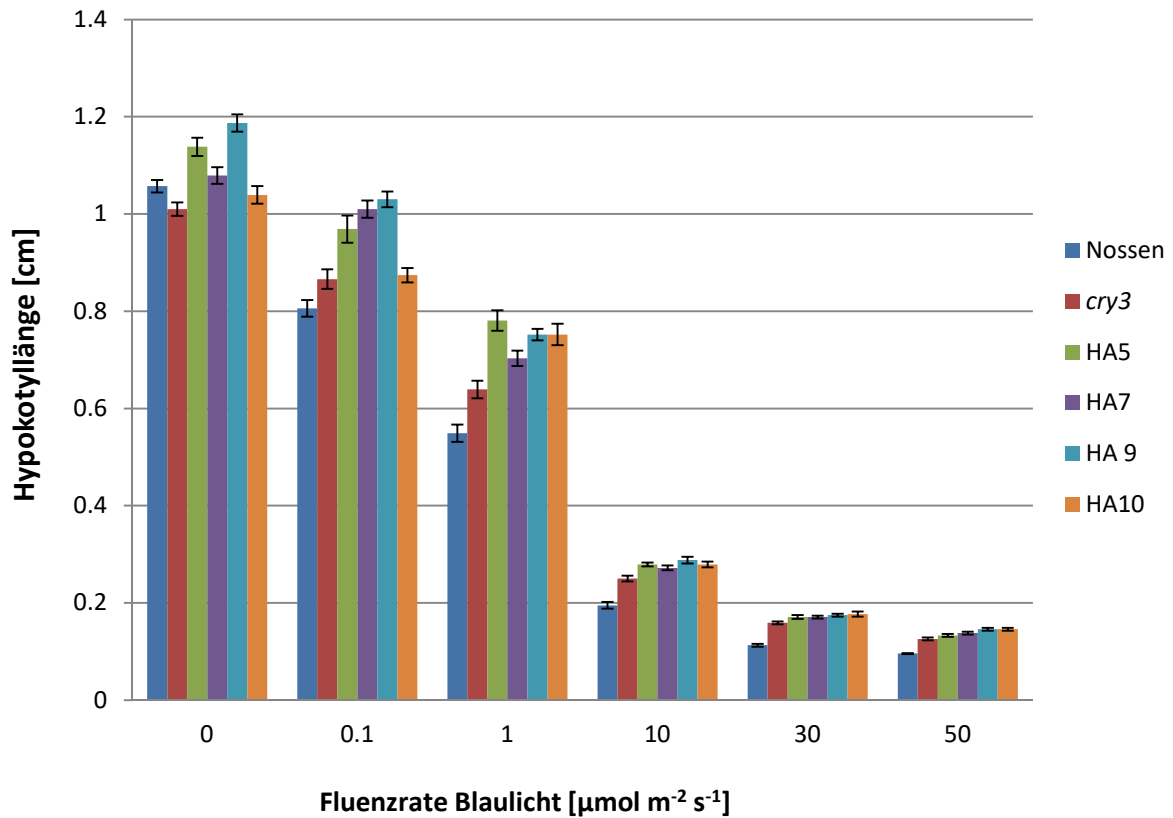


Abbildung 6.1 Hypokotyllängen gemessen von Maribel Dioniso-Sese.

Arabidopsis-Keimlinge wurden nach Stratifikation für 4 Tage im Dunkeln bzw. unter Blaulicht verschiedener Fluenzraten auf ½ MS-Platten angezogen. Jeweils 20 Keimlinge wurden fotografiert und mit Image J vermessen. Untersucht wurden die Wildtypen Nossen und die *cry3* Mutante (Transposoninsertionslinie von RikenWT) und die Überexpression von *cry3*-HA (HA5, HA7, HA9 und HA10) im *Ler* Hintergrund. Die gemessenen Hypokotyllängen sind in cm dargestellt und die Fehlerbalken zeigen den jeweiligen Standardfehler.

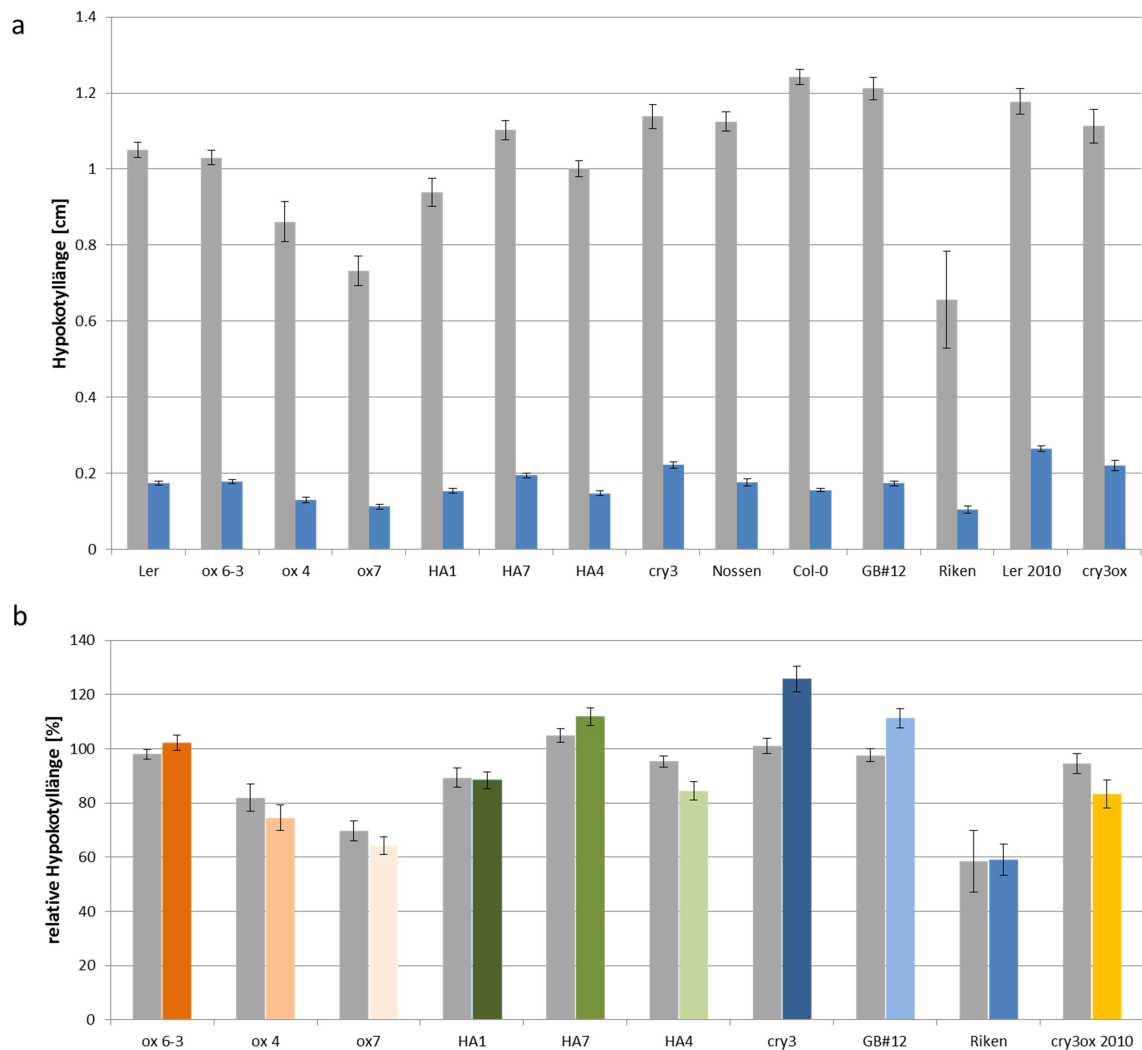


Abbildung 6.2 Absolute und relative Hypokotyllängen von Keimlingen unterschiedlicher transgener Linien

Arabidopsis-Keimlinge wurden nach Stratifikation für 4 Tage im Dunkeln (graue Balken) bzw. unter Blaulicht ($10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (farbige Balken) auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten angezogen. Jeweils 20 Keimlinge wurden fotografiert und mit Image J vermessen (auf Grund der schlechten Keimung für ox4 mindestens 14 und für RikenWT mindestens 6 Keimlinge). Untersucht wurden die Wildtypen Ler, Nossen und Col-0, die Transposon-Insertion von RikenWT (*cry3*) und die T-DNA Insertion von GABI-Kat (GB#12) (im Col-0 Hintergrund) und außerdem die Überexpressionslinien von *cry3* (ox6-4, ox4, ox7) und *cry3*-HA (HA1, HA4, HA7) im Ler Hintergrund. Bei RikenWT handelt es sich um Saatgut, welches durch Selbstung der heterozygoten *cry3* Mutante und Selektion auf das Wildtyp-Allel erhalten wurde. In **a** sind die gemessenen Hypokotyllängen in cm gezeigt während in **b** das Verhältnis von transgener Linie zu Wildtyp in % dargestellt ist, die grauen Balken zeigen das Verhalten im Dunkeln und die farbigen unter Blaulicht. Die Fehlerbalken zeigen den jeweiligen Standardfehler.

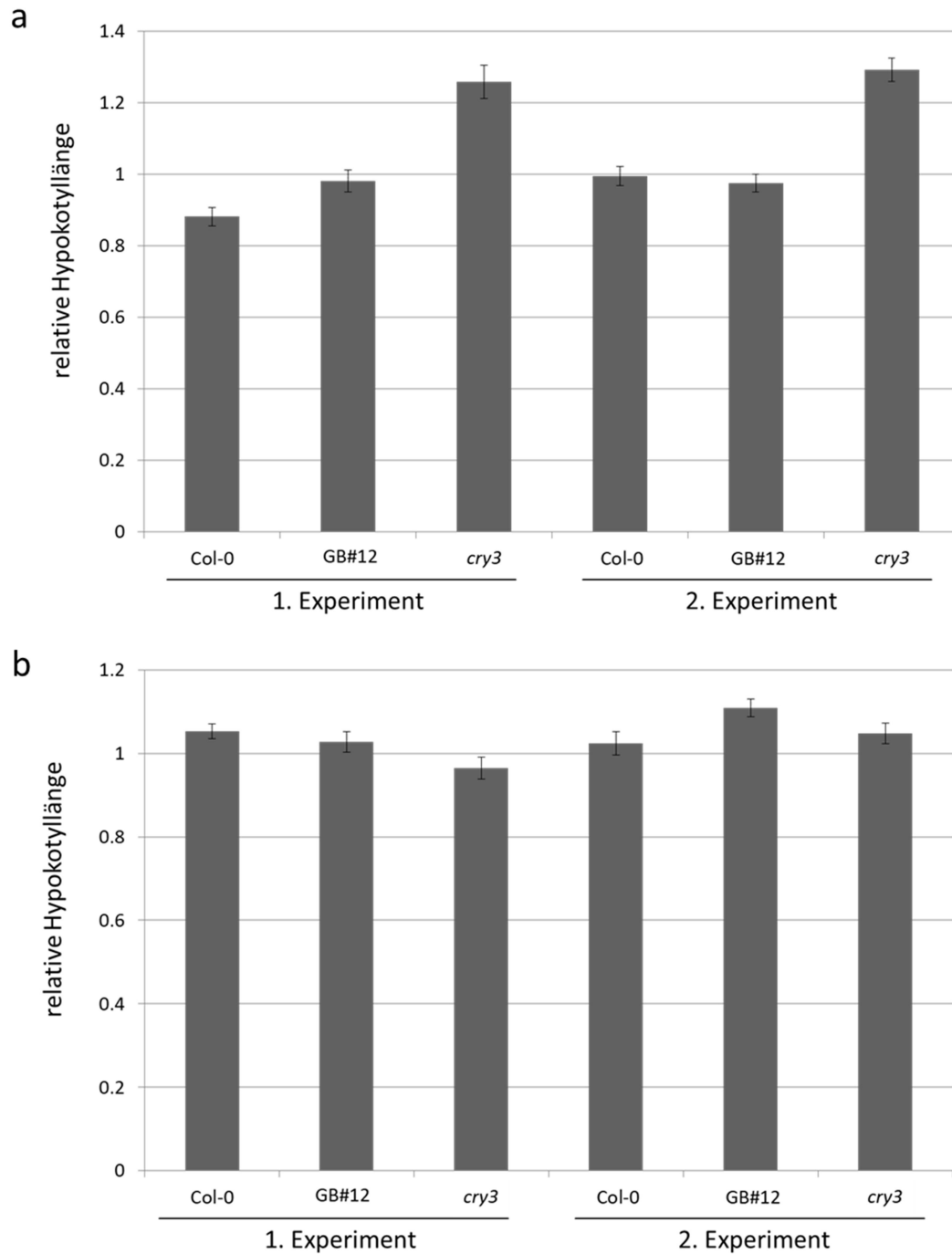


Abbildung 6.3 relative Hypokotyllänge von Col-0, GB#12 und *cry3* in Blaulicht und im Dunkeln.

Arabidopsis-Keimlinge wurden nach Stratifikation für 4 Tage unter Blaulicht ($10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (a) bzw. im Dunkeln (b) auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten angezogen. Jeweils 20 Keimlinge wurden fotografiert und mit Image J die Längen ausgewertet. Untersucht wurden die Wildtypen Nossen und Col-0, die Transposon-Insertion von RikenWT (*cry3*) und die T-DNA Insertion von GABI-Kat (GB#12)(im Col-0 Hintergrund). Die Normierung erfolgte gegen die Hypokotyllänge von Nossen aus dem jeweiligen Experiment im Licht bzw. Dunkeln. Die Fehlerbalken zeigen den jeweiligen Standardfehler.

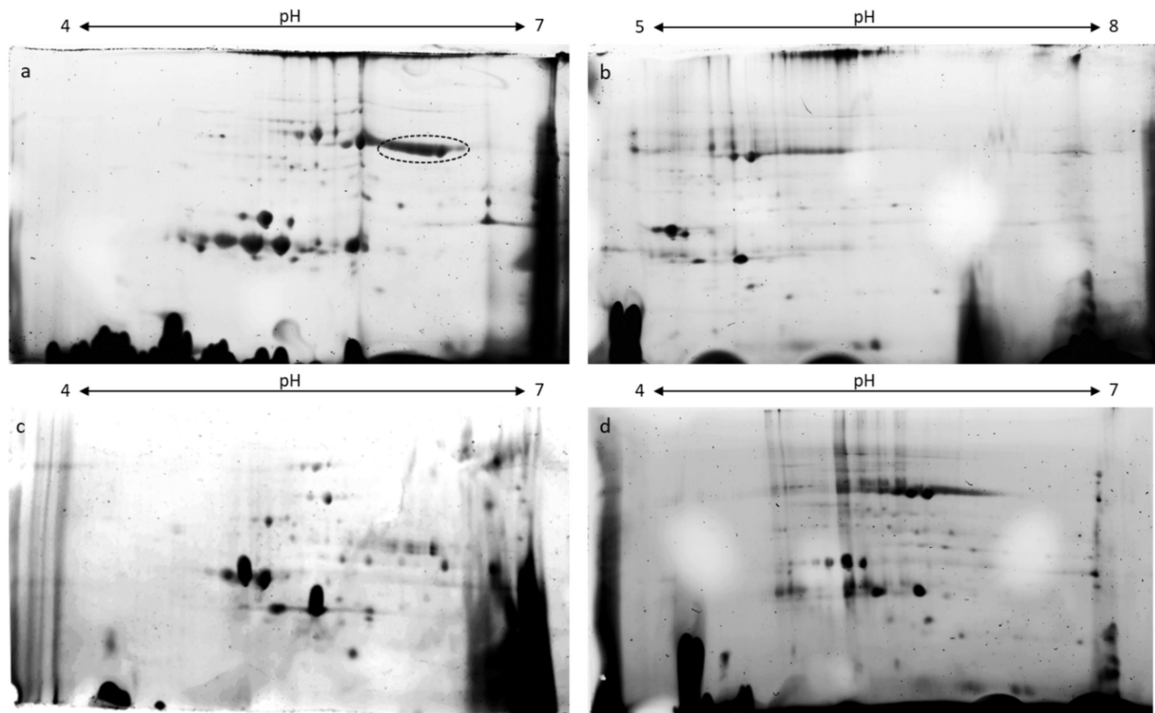


Abbildung 6.4 Auftrennung von Chloroplastengesamtexttrakten mittels 2D-DIGE.

Chloroplasten wurden aus ca. 9 Wochen altem Blattmaterial von dem Nossen Wildtyp und der *cry3* Mutante isoliert. Die Proteine wurden in PEG Puffer solubilisiert und unlösliche Bestandteile wie Stärke durch Zentrifugation abgetrennt (siehe 2.4.1.8.1). Die Proben in **a** und **b** wurden mit TCA/Aceton präzipitiert, mit Aceton gewaschen und in RHB aufgenommen. In **c** wurde die Probe zunächst mit PEG fraktioniert und die Überstandsfraction mit TCA/Aceton gefällt während in **d** eine unfraktionierte Probe mit Aceton präzipitiert wurde. **a**, **b** und **d** zeigt den mit Cy2 markierten Standard (1:1 Mischung aus Nossen und *cry3*) über einen pH von 4-7 aufgetrennt, in **b** wurden IPG Strips mit pH 5-8 verwendet. Für die zweite Dimension wurden 12% Polyacrylamid-Gele verwendet.

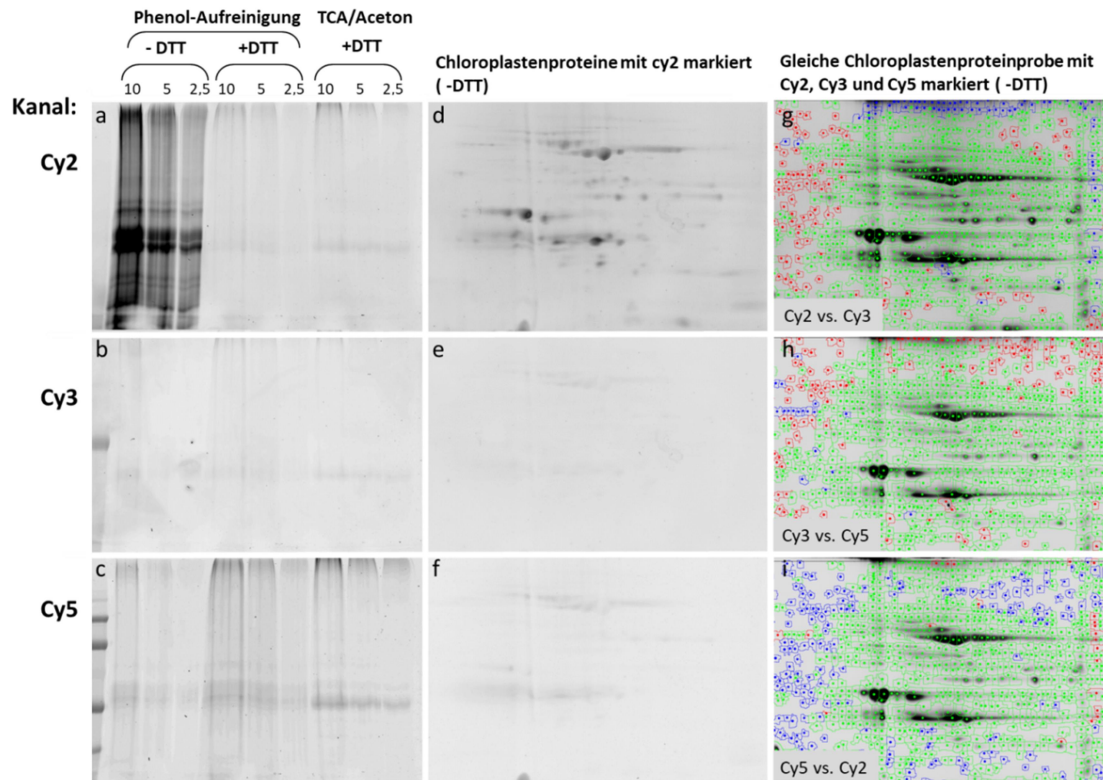


Abbildung 6.5 DTT zeigt einen deutlichen Einfluss auf die Markierung mit CyDyes.

Chloroplasten wurden aus ca. 9 Wochen altem Blattmaterial von dem *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Nossen isoliert. Die Proteine wurden mit PEG Puffer isoliert und in **a** bis **c** mittels Phenol-Aufreinigung oder TCA/Aceton präzipitiert. Für die Markierung mit Cy2 wurden die Proben in RHB mit DTT (+DTT) oder einem vergleichbaren Puffer (MB) ohne DTT (-DTT) aufgenommen (siehe 2.4.5.1). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE über ein 10% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. In **d** bis **i** wurden die Proben mit TCA/Aceton gefällt und in Puffer ohne DTT aufgenommen. In **d** bis **f** wurde die Probe mit Cy2 markiert in **g** bis **i** wurden identische Proben mit Cy2, Cy3 und Cy5 markiert. Die IEF in **d** bis **i** erfolgte mit IPG Strips pH 4 bis 7 und die zweite Dimension stellte eine SDS-PAGE über 12% Polyacrylamid-Gele dar. Alle Gele wurden mit dem Typhoon® Scanner in den angegebenen Kanälen und bei einer Intensität von ca. 500 V visualisiert.

10	20	30	40	50	60
MAASSLSLSS	PLSNPLRRFT	LHHLHLSKKP	LSSSSLFLCS	AAKMNDHIHR	VPALTEEEID
70	80	90	100	110	120
SVAIKTFERY	ALPSSSSVKR	KGKGVTLWF	RNDLRVLDND	ALYKAWSSSD	TILPVYCLDP
130	140	150	160	170	180
RLFHTTHFFN	FPKTGALRGG	FLMECLVDLR	KNLMKRGLNL	LIRSGKP EEI	LPSLAKDFGA
190	200	210	220	230	240
RTVFAHKETC	SEEVDVERLV	NQGLKRVGNS	TKLELIWGST	MYHKDDL PFD	VFDLPDVYTQ
250	260	270	280	290	300
FRKSVEAKCS	IRSSTRIPLS	LGPTPSVDDW	GDVPTLEKLG	VEPQEVTRGM	RFVGGESAGV
310	320	330	340	350	360
GRVFEYFWKK	DLLKVYKETR	NGMLGPDYST	KFSPWLAFGC	ISPRFIYEEV	QRYEKERVAN
370	380	390	400	410	420
NSTYWVLFEL	IWRDYFRFLS	IKCGNSLFHL	GGPRNVQGKW	SQDQKLFESW	RNAKTGYPLI
430	440	450	460	470	480
DANMKELSTT	GFMSNRGRQI	VCSFLVRDMG	LDWRMGAEFW	ETCLLDYDPC	SNYGNWTYGA
490	500	510	520	530	540
GVGNDPREDR	YFSIPKQAQN	YDPEGEYVAF	WLQQLRRLPK	EKRHWPGRLM	YMDTVVPLKH
550	560	570	580		
GNGPMAGGSK	SGGGFRGSHS	GRRSRHNGPS	AAAAAAYPYD	VPDYA	

Abbildung 6.6 ESI-TOF Hits in cry3-HA.

Die ColPs wurden mit cry3-HA durchgeführt, die Eluate mittels ESI-TOF LC/MS (siehe 2.4.10.2) untersucht. Hier gelb unterlegt dargestellt sind die gefundenen Peptide die cry3 zugeordnet wurden. Unterstrichen markiert den Start eines angrenzenden Peptids. Grau hinterlegt ist die Chloroplastenimportsequenz, in rot dargestellt ist der Alanin-Linker und ein durch die Klonierung bedingtes Serin, in blau der HA-tag.

10	20	30	40	50	60
MAASSLSLSS	PLSNPLRRFT	LHHLHLSKKP	LSSSSLFLCS	AAKMNDHIHR	VPALTEEEID
70	80	90	100	110	120
SVAIKTFERY	ALPSSSSVKR	KGKGVITLWF	RNDLRVLDND	ALYKAWSSSD	TILPVYCLDP
130	140	150	160	170	180
RLFHTTHFFN	FPGTGALRGG	FLMECLVDLR	KNLMKRGLNL	LIRSGKPEEI	LPSLAKDFGA
190	200	210	220	230	240
RTVFAHKETC	SEEVDVERLV	NQGLKRVGNS	TKLELIWGST	MYHKDDLPPD	VFDLPDVYTQ
250	260	270	280	290	300
FRKSVEAKCS	IRSSTRIPLS	LGPTPSVDDW	GDVPTLEKLG	VEPQEVTRGM	RFVGGESAGV
310	320	330	340	350	360
GRVFEYFWKK	DLLKVYKETR	NGMLGPDYST	KFSPWLAFC	ISPRFIYEEV	QRYEKERVAN
370	380	390	400	410	420
NSTYWVLFEL	IWRDYFRFLS	IKCGNSLFHL	GGPRNVQGW	SQDQKLFESW	RNAKTGYPLI
430	440	450	460	470	480
DANMKELSTT	GFMSNRGRQI	VCSFLVRDMG	LDWRMGAEF	ETCLLDYDPC	SNYGNWYGA
490	500	510	520	530	540
GVGNDPR	EDR	YFSIPKQAQN	YDPEGEYVAF	WLQQLRRLPK	EKRHWPGRLM
550	560	570	580	590	600
GNGPMAGGSK	SGGGFRGSHS	GRRSRHNGPA	MGKGELFTGV	VPILVELDGD	VNGHKFSVSG
610	620	630	640	650	660
EGEGDATYVK	LTLKFICTTG	KLPVPWPTLV	TTFSYGVQCF	SRYPDHMKRH	DFFKSAMPEG
670	680	690	700	710	720
YVQERTIFFK	DDGNYKTRAE	VKFEGDTLVN	RIELKGIDFK	EDGNILGHKL	EYNYNSHNVY
730	740	750	760	770	780
IMADKQKNGI	KVNFKIRHNI	EDGSVQLADH	YQONTPIGDG	PVLLPDNHYL	STQSALSKDP
790	800	810			
NEKRDHMLLL	EFVTAAGITH	GMDELYRSI			

Abbildung 6.7 ESI-TOF Hits in cry3-GFP.

Die CoIPs wurden mit cry3-GFP durchgeführt, die Eluate mittels ESI-TOF LC/MS (siehe 2.4.10.2) untersucht. Hier gelb unterlegt dargestellt sind die gefundenen Peptide die cry3 zugeordnet wurden. Unterstrichen markiert den Start eines angrenzenden Peptids. Grau hinterlegt ist die Chloroplastenimportsequenz, in grün die Sequenz von GFP (stammend aus dem Plasmid pAVA393, eine Variante von mGFP5 (unter anderem mit der S65T Mutation) und ein durch die Klonierung bedingtes Alanin in rot.

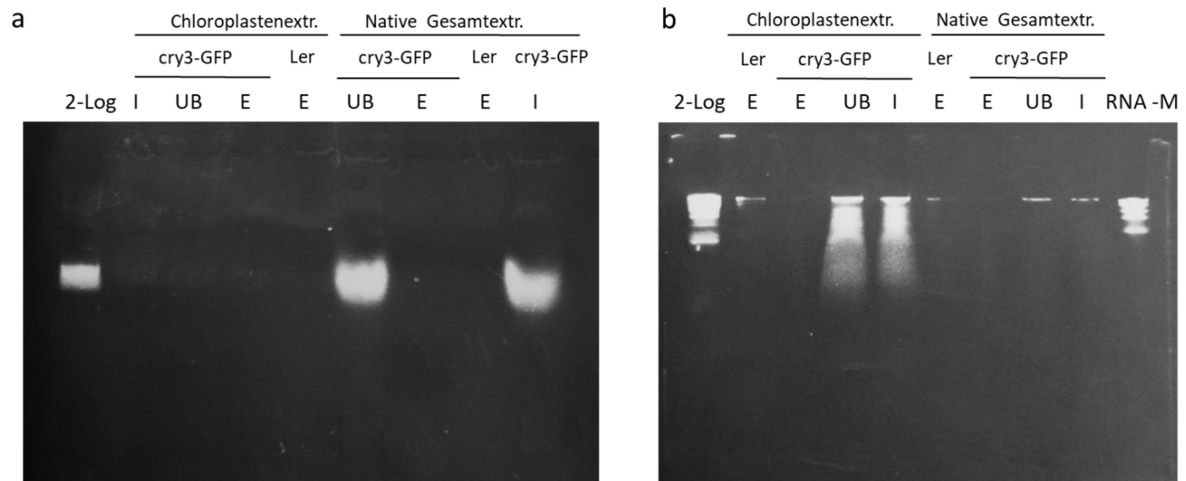


Abbildung 6.8 CoIP mit cry3-GFP zeigt keine Hinweise auf eine spezifische Bindung von Nukleinsäuren.

Lösliche, native Gesamtextrakte und Chloroplastenextrakte in nativem Puffer wurden aus *Ler* und der cry3-GFP exprimierenden Linien hergestellt. Eingesetzt wurde Blattmaterial adulter, im Kurztag gewachsene Pflanzen, 7,5 g für die Chloroplastenisolation und etwa 0,6-0,7 g für die Gesamtextrakte. In die CoIP eingesetzt wurden ca. 0,12 mg Proteine aus den Chloroplastenextrakten und ca. 1,1 mg aus den Gesamtextrakten. Die Elution erfolgte durch Aufkochen in Nuklease freiem Wasser (25 µl). In (a) wurden 12 µl des Inputs (I), der ungebundenen Proteine (UB) sowie der Eluate (E) mit 5x Ladepuffer gemischt und auf einem 7,5% Agarosegel aufgetrennt. In (b) wurden 7,5 µl der entsprechenden Proben mit 2x RNA Loading Dye (Fermentas) gemischt und auf einem 10% Polyacrylamid-Gel mit 7 M Harnstoff getrennt. Als Marker wurde die 2-Log DNA Ladder von NEB (2-Log) und der Riboruler high range von Fermentas (RNA-M) eingesetzt.

Alignment der Proteinsequenz des Inserts L12 mit DPE2

```

Insert      HLRFVQAKRMMNLGSLSLSTSKSSKPMVSISFWIPYFTHWGESLLVCGSAPGLGSGNVKK
DPE2        -----MMNLGSLSLSTSKSSKPMVSISFWIPYFTHWGESLLVCGSAPGLGSGNVKK
              *****

Insert      GLLLKPSQQDDQLIWSGSVSVPPPGFSSDYCYVVDSDKSVLRSEFGMKRKLVPETLTGG
DPE2        GLLLKPSQQDDQLIWSGSVSVPPPGFSSDYCYVVDSDKSVLRSEFGMKRKLVPETLTGG
              *****

Insert      ESVHLRDLWQSGDQALPFRSAFKDVI FHHSFDVKVEKPLGVFMNKSDQDDSVVVQFKICC
DPE2        ESVHLRDLWQSGDQALPFRSAFKDVI FHHSFDVKVEKPLGVFMNKSDQDDSVVVQFKICC
              *****

Insert      PDIGEGTSVYVLGTPEKLGKWKVENGLRLNYVDDSIWEADCLIPKADFPIKYRYCKVQKE
DPE2        PDIGEGTSVYVLGTPEKLGKWKVENGLRLNYVDDSIWEADCLIPKADFPIKYRYCKVQKE
              *****:*****

Insert      DSIGFESGGNRELSLHSIGSKQEYIVMSDGLFRAMPWRGAGVAVPMFSVRSEDDVGVEGF
DPE2        DSIGFESGGNRELSLHSIGSKQEYIVMSDGLFRAMPWRGAGVAVPMFSVRSEDDVGVEGF
              *****

Insert      LDLKLLVDWAVDSGLHLVQLLPVNDTSVHKMWWDSPYSSLSVFALHPLYLRVQALSERL
DPE2        LDLKLLVDWAVDSGLHLVQLLPVNDTSVHKMWWDSPYSSLSVFALHPLYLRVQALSERL
              *****

Insert      PEDIKEEIQKAKNQLDKNDVDYEATMETKLSIAKKIFDIEKDQTLNSSTFQKFFSENEGW
DPE2        PEDIKEEIQKAKNQLDKNDVDYEATMETKLSIAKKIFDIEKDQTLNSSTFQKFFSENEGW
              *****

Insert      LKPYA AFCFLRDF FETSDHSQWGTFSDYTDDKLEKLISKDNLHYNTICFHYYIQYHLHVQ
DPE2        LKPYA AFCFLRDF FETSDHSQWGTFSDYTDDKLEKLISKDNLHYNTICFHYYIQYHLHVQ
              *****

Insert      LSAAA EYARKKG VVLKGDLP IG-----
DPE2        LSAAA EYARKKG VVLKGDLP IGVDNRNSVDTWVYRNLF RMNTSTGAPPDYFDKNGQN WGF
              *****

Insert      -----
DPE2        TYNWEEMSKDNYAWWRARLTQMGKYFTAYRIDHILGFFRIWELPAHAMTGLVGKFRPSIP

Insert      -----
DPE2        LSQEELEKEGIWDFDRLSKPYIQKKFLEEKFGDFWPFIASNFLNETQKDMYEFKEDCNTE

Insert      -----
DPE2        KKIVAKLKS LAEKS LLENEDKVRDVF DILRNVL IKDPEDARFYPRFNIEDTSS FQD

Insert      -----
DPE2        LDDH SKNV LKRLYDY YFQRQEDLWRKNALKTLPALLNSSNMLACGEDLGLIPSCVHPVM

Insert      -----
DPE2        QELGLVGLRIQRMPSESDVKFGIPSNYDYMTVCAPSCHDCSTLRAWWEDEERRQQYFKE

Insert      -----
DPE2        VIGVDGIPPSQCIPEITHFILRQHVEAPSMWAI FPLQDMMALKEEY TTRPATEETINDPT

Insert      -----
DPE2        NPKHYWRYRVHVTLD SLLKDTDLKSTIKNLVSSSGRSVPANVSGEDINKSRGEVIANGST

Insert      ----
DPE2        KPNP

```

Alignment der Proteinsequenz des Inserts D27 mit NUP205

```

Insert      -----
NUP205      MVSPKDLVAIVHSSLLGTSRPTPTQRIELTHAIRNSFPSLQNLSSFPPKPSDRAQVQSK

Insert      -----
NUP205      EIRLPDSLPISLDDQDIAISLKLSDDELHLNEIDSVRLLVSSNQEWGLMGRDPLEIQRLAT

Insert      -----
NUP205      GLWYTGRDLTSTLYTLRAVVLDEGLEPDLIADIQGLLEELIEAGLRQLITLIKELNR

Insert      -----
NUP205      EDPTGLGGPLCERYLIDSRGALVERRRAVVQRERLILGHCLVLSILVDRPGSKDVKDIYYI

Insert      -----
NUP205      LKDAAQLTEGNDTISSQITFSLFLIITFVSDAISRLSDKSSMISQDASFRDTFQDIV

Insert      -----
NUP205      MASGSDPTADGFIGGIRLAWAVHMLIHDGISGMDTISTASTTDMGHICSCLESIFSKNV

Insert      -----
NUP205      FQFLLDNVLRTAAYQNDEEDIYYIYNAYLHKLASCFLSHPIARDKVESKDMAMSVLNSY

Insert      --PDPLDGSMQTEESDRPLPFISLMEFVSKIYQKEPELLSGNDVLWTFVNFAGEDHTNFK
NUP205      RTSDPLDGSMQTEESDRPLPFISLMEF-----KEPELLSGNDVLWTFVNFAGEDHTNFK
                *****

Insert      TLVAFLEMLCTLASTQEGASKVYELLRGTSFRSIGWPTLFDCIRIYDEKFKQSLQTAGAM
NUP205      TLVAFLEMLCTLASTQEGASKVYELLRGTSFRSIGWPTLFDCIRIYDEKFKQSLQTAGAM
                *****

Insert      MPEFLEGDAKALVAYLNVLQKVVENGNTPTERKNWFPDIEPFFKLLGYENIPPYLKALRK
NUP205      MPEFLEGDAKALVAYLNVLQKVVENGNTPTERKNWFPDIEPFFKLLGYENIPPYLKALRK
                *****

Insert      TIAAFVNVFPFMRDSIWAFLEQYDLPVVVGSQVGKSDQSSQVYDMQFELNEVEARREQYP
NUP205      TIAAFVNVFPFMRDSIWAFLEQYDLPVVVGSQVGKSDQSSQVYDMQFELNEVEARREQYP
                *****

Insert      STISFLNLINALIAGEKDVNDRGRRFIGIFRFVYDHVFTFPFPQRAYSDPCEKWQLVVACL
NUP205      STISFLNLINALIAGEKDVNDRGR-----RAYSDPCEKWQLVVACL
                *****

Insert      QHFHMLSMDYIQEEDLDGFTFHPHFLVSLETSSLQTLPIIELLKDFMNGKALYRNLMG
NUP205      QHFHMLSMDYIQEEDLDGFTFHPHFLVSLETSSLQTLPIIELLKDFMSGKALYRNLMG
                *****

Insert      ILQVGVNSIIISERLSKTYGKILEKAVQLSLEILLVFEKDLLVSDVWRPLYQPLDIILSQ
NUP205      ILQVGVNSIIISERLSKTYGKILEKAVQLSLEILLVFEKDLLVSDVWRPLYQPLDIILSQ
                *****

Insert      DHNQIIALLEYVRYDSLPIQIRSSIKIMNLS-SRLVGLVPMLIKIDAANSLIEDYAACL
NUP205      DHNQIIALLEYVRYDSLPIQIRSSIKIMNLRCSRLVGLVPMLIKIDAANSLIEDYAACL
                *****

Insert      EGRLEEGEVVENSDDLGLVIMQLLVDNINRPAPSITHLLKFDLDAPVEGTV-----
NUP205      EGRLEEGEVVENSDDLGLVIMQLLVDNINRPAPSITHLLKFDLDAPVEGTVLQPKFHY
                *****

Insert      -----
NUP205      SCLKVILEMLEKLPNPDINFLLEFGFQLLCELNLDPLTSGPTMDLLSSKKYQFFLQHL

```

Insert	-----
NUP205	TIGVATLPKRSGSQALRISSLHQRAWLLKLLAIALHTGSGSSSAHLEACQSILSHLFGRE
Insert	-----
NUP205	VTEAANEPFSSSTYPQDGLDYAGTSSISKSKALALLEILQFRSPDASMQLPQIVSSLKYD
Insert	-----
NUP205	SLVEDILGNRDTSVSGSIYYYSERGDRLIDLSSFSNKLWQKLHSGFPLVDSFPNVAELSE
Insert	-----
NUP205	VRETIQQLLKWGWKYNRNLEEQAQLHMLAGWSQIVEVSACRRISSLDNRSEILYRILDA
Insert	-----
NUP205	SLSASASPDCLKMAFVLTQVALTCIAKLRRDRFSFGALSSDVTCLDVMVKHLSTGA
Insert	-----
NUP205	CHSVLFKLVMAILRHESSESLRRRQYALLLSYFYQCQHMIALDVPTSVMVQFLLNEQDGE
Insert	-----
NUP205	DLDIQKIDKEQADLARANFFIIKKEAQGILDVVIKDASQGSEFGKTISLYVLEALVCIDH
Insert	-----
NUP205	ERYFLSQLQSRGFIRSCLSISNISYQDGHLLSQQRACLEAELALLRISHKYGKSG
Insert	-----
NUP205	GQVLFSGMALEHIASCRAISFKGNMRRVDMKLQSDVGYNVQKQRTIITAVLRLVFALTSL
Insert	-----
NUP205	VETSEFFEGRNKIVRDVVEFIKGHQSFLDQLLREDFTQADDLLMEQIILAVGILSKVWPF
Insert	-----
NUP205	EENDGYGFVQGLFDMMSKLFIA SPIKSILSQGSELKLSQLRFSLSYLYFLVTKNLSRLQ
Insert	-----
NUP205	VSDSLDSSTKLKQPTLLLLASLLSHVTDSESLERAAEKKSLLLHKIRDINELSRQDVDAII
Insert	-----
NUP205	KICDSQEYVTPSDNIHKRRYIAMVEMCQIVGNRDQLITLLLQLAEHVLNIIILHLQDRSV
Insert	-----
NUP205	SSNERGSYGSKSHIQQEVTDLCGKLSPTIDRLALLNEGKVGHNKLVFQRLATTVKEMAIQ
Insert	---
NUP205	KCV

Abbildung 6.9 Alignments mit DPE12 und NUP205.

Das Proteinsequenz-Alignment wurde mit Clustal Omega durchgeführt (Sievers *et al.*, 2011). Die Sequenz der Inserts L12 und D27 wurde anhand des verwendeten ORFs in die Aminosäuresequenz übersetzt und mit den entsprechenden Proteinen DPE2 bzw. NUP205 abgeglichen, deren Sequenzen Uniprot entnommen sind (Consortium, 2012).

6.2 Tabellen

Tabelle 6.1 Identifikation der in der *cry3* Mutante differentiell exprimierter Spots mittels MALDI-TOF.

Die in Abbildung 3.12 markierten Spots wurden mit MALDI-TOF MS identifiziert. Die Datenbankabfrage erfolgte mit Mascot, die erhaltenen *scores*, die Anzahl von Massen die gefunden wurden (*Querys matched*) und die Sequenz die durch diese abgedeckt wird (*Sequence coverage*) sind angegeben. Bei der Durchführung von MALDI-TOF MS/MS ist zusätzlich das gefundene Peptid mit der detektierten Masse (*mass observed*) aufgeführt. Ein positiver Wert für die mittlere Änderung zeigt, dass der Spot in der *cry3* Mutante um das x-fache stärker und einen negativer um das x-fache schwächer repräsentiert war als im Wildtyp.

Spot Nr.	average ratio	MALDI-TOF MS				MALDI-TOF MS/MS		
		Name	score	Querys matched	Sequence coverage	Peptide	mass (observed)	Score
1	1,52	RA1	67	5	23%			
2	1,74	RA1	73	8	26%	R.VPIICTGNDFSTLYAPLIR.D	2150.14	52
3	1,67	RA1	75	10	39%	R.VPIICTGNDFSTLYAPLIR.D	2150.14	98
4	1,51	GLNA2	121	8	31%			
5	1,52	EFTU	66	8	25%	K.ILDEALAGDENVGLLLR.G	1681.95	23
6	1,61	PGK 1 (fragment)	64	4	14%	K.FSLAPLVPR.L	999.59	32
						K.FLKPSVAGFLLQK.E	1447.81	35
						K.LASLADLYVNDAFGTAHR.A	1933.97	57
						R.ADLNVPLDDNQITDDTR.I	2015.96	95
7	1,59	PGK 1	74	8	24%	K.FLKPSVAGFLLQK.E	1447.86	43
						K.LASLADLYVNDAFGTAHR.A	1933.99	70
						R.ADLNVPLDDNQITDDTR.I	2015.94	86
8	1,67	Mixture	147	13				
		PGK1 (fragment)	70	6	24%	K.FSLAPLVPR.L	999.65	41
						K.LASLADLYVNDAFGTAHR.A	1933.97	67
		PRK	79	7	?	R.KPDFDAFIDPQK.Q	1420.74	59
						K.ILVIEGLHPMFDER.V	1668.86	33
						K.YFSPVYLFDEGSTISWIPCGR.K	2494.14	34
9	1,75	PRK	116	13	50%			
10	1,7	RA2	73	8	29%			
11	1,81	RA 2	66	6	26%			
12	1,65	RA 2	69	8	27%			
13	-1,72	?						
14	-1,57	Mixture	156	13				
		PAP1	83	7	34%			
		PSBO1/2	84	7	31%	K.EEDGIDYAAVTVQLPGGER.V	2018.9	83
						R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G	1562.8	60
15	-2,36	PAP2	76	5	33%	K.VDEISQTIDSDNFTVQNSVR.F	2267.14	83
17	-1,74	PAP2	106	7	35%	R.SLVDSLYGTDR.G	1225.62	37
18	-1,58	PAP2				K.VDEISQTIDSDNFTVQNSVR.F	2267.09	28
		PSBO1/2	55	4	20%	R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G	1562.74	62
(18	-1,58)	PAP6				K.TSGNLSQIPFDIPR.L	1641.84	42
						R.LIPVTLGQVFQR.I	1370.81	45
19	-1,51	PSBO2	98	7	30%	R.GGSTGYDNAVALPAGGR.G	1562.76	21

6.3 Quellen

- Altmann, T., Damm, B., Halfter, U., Willmitzer, L. and Morris, P.-C. (1992) 'Protoplast transformation and methods to create specific mutants in *Arabidopsis thaliana*', *Methods in Arabidopsis Research* (Koncz, Cs., Chua, N.-H. and Schell, J., eds.) Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp. 310-330.
- Ahmad, M. and Cashmore, A. R. (1993) 'HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor.', *Nature*, 366(6451), pp. 162-6.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) 'Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.' *Nature*, 408(6814), pp. 796-815.
- Baker, T. S., Eisenberg, D. and Eiserling, F. (1977) 'Ribulose biphosphate carboxylase: a two-layered, square-shaped molecule of symmetry 422', *Science*, 196(4287), pp. 293-5.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. and Buchanan, B. B. (2003) 'Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1), pp. 370-5.
- Banerjee, R., Schleicher, E., Meier, S., Viana, R. M., Pokorny, R., Ahmad, M., Bittl, R. and Batschauer, A. (2007) 'The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone', *J Biol Chem*, 282(20), pp. 14916-22.
- Batschauer, A. (1993) 'A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage', *Plant J*, 4(4), pp. 705-9
- Bang, W. Y., Kim, S. W., Jeong, I. S., Koiwa, H. and Bahk, J. D. (2008) 'The C-terminal region (640-967) of *Arabidopsis* CPL1 interacts with the abiotic stress- and ABA-responsive transcription factors', *Biochem Biophys Res Commun*, 372(4), pp. 907-12.
- Blödner, C., Goebel, C., Feussner, I., Gatz, C. and Polle, A. (2007) 'Warm and cold parental reproductive environments affect seed properties, fitness, and cold responsiveness in *Arabidopsis thaliana* progenies', *Plant Cell Environ*, 30(2), pp. 165-75.
- Bonk, T. and Humeny, A. (2001) 'MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA.', *Neuroscientist*, 7(1), pp. 6-12.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. and Toole, V. K. (1952) 'A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 38(8), pp. 662-6.
- Botto, J. F., Sanchez, R. A., Whitelam, G. C. and Casal, J. J. (1996) 'Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 110(2), pp. 439-444.
- Bouly, J. P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E. A., Batschauer, A. and Ahmad, M. (2003) 'Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1', *Eur J Biochem*, 270(14), pp. 2921-8.
- Bouly, J. P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R. and Ahmad, M. (2007) 'Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states', *J Biol Chem*, 282(13), pp. 9383-91.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Brandão, M. M., Dantas, L. L. and Silva-Filho, M. C. (2009) 'AtPIN: *Arabidopsis thaliana* protein interaction network', *BMC Bioinformatics*, 10, pp. 454.

- Briggs, W. R. and Christie, J. M. (2002) 'Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors.', *Trends Plant Sci*, 7(5), pp. 204-10.
- Brown, B. A., Cloix, C., Jiang, G. H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D. J. and Jenkins, G. I. (2005) 'A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50), pp. 18225-30.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. and Getzoff, E. D. (2003a) 'Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution', *Mol Cell*, 11(1), pp. 59-67.
- Burgie, E. S., Bussell, A. N., Walker, J. M., Dubiel, K. and Vierstra, R. D. (2014) 'Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(28), pp. 10179-84.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. and Hendricks, S. B. (1959) 'DETECTION, ASSAY, AND PRELIMINARY PURIFICATION OF THE PIGMENT CONTROLLING PHOTORESPONSIVE DEVELOPMENT OF PLANTS.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 45(12), pp. 1703-8.
- Byrdin, M., Eker, A. P., Vos, M. H. and Brettel, K. (2003) 'DisSECTION of the triple tryptophan electron transfer chain in Escherichia coli DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15), pp. 8676-81.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A. and Botto, J. F. (1998) 'Modes of action of phytochromes', *Journal of Experimental Botany*, 49(319), pp. 127-138.
- Casal, J. J., Candia, A. N. and Sellaro, R. (2014) 'Light perception and signalling by phytochrome A', *J Exp Bot*, 65(11), pp. 2835-45.
- Castrillo, M. und Avalos, J. (2015) 'The flavoproteins CryD and VvdA cooperate with the white collar protein WcoA in the control of photocarotenogenesis in Fusarium fujikuroi', *PLoS One*, 10(3), pp. e0119785.
- Castrillo, M., Bernhardt, A., Ávalos, J., Batschauer, A. and Pokorny, R. (2015) 'Biochemical Characterization of the DASH-Type Cryptochrome CryD From Fusarium fujikuroi', *Photochem Photobiol*, 91(6), pp. 1356-67.
- Castrillo, M., García-Martínez, J. and Avalos, J. (2013) 'Light-dependent functions of the Fusarium fujikuroi CryD DASH cryptochrome in development and SECondary metabolism', *Appl Environ Microbiol*, 79(8), pp. 2777-88.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T., Batschauer, A. and Ahmad, M. (2011) 'The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals.', *Annu Rev Plant Biol*, 62, pp. 335-64.
- Chen, F., Li, B., Li, G., Charron, J. B., Dai, M., Shi, X. and Deng, X. W. (2014) 'Arabidopsis Phytochrome A Directly Targets Numerous Promoters for Individualized Modulation of Genes in a Wide Range of Pathways', *Plant Cell*, 26(5), pp. 1949-1966.
- Chen, M., Tao, Y., Lim, J., Shaw, A. and Chory, J. (2005) 'Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals', *Curr Biol*, 15(7), pp. 637-42.
- Chevallet, M., Luche, S. and Rabilloud, T. (2006) 'Silver staining of proteins in polyacrylamide gels.', *Nat Protoc*, 1(4), pp. 1852-8.
- Christie, J. M. (2007) 'Phototropin blue-light receptors', *Annu Rev Plant Biol*, 58, pp. 21-45.
- Christie, J. M., Arvai, A. S., Baxter, K. J., Heilmann, M., Pratt, A. J., O'Hara, A., Kelly, S. M., Hothorn, M., Smith, B. O., Hitomi, K., Jenkins, G. I. and Getzoff, E. D. (2012) 'Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges', *Science*, 335(6075), pp. 1492-6.

- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J. and Sullivan, S. (2015) 'Plant flavoprotein photoreceptors', *Plant Cell Physiol*, 56(3), pp. 401-13.
- Christie, J. M., Suetsugu, N., Sullivan, S. and Wada, M. (2018) 'Shining Light on the Function of NPH3/RPT2-Like Proteins in Phototropin Signaling', *Plant Physiol*, 176(2), pp. 1015-1024.
- Chun, L., Kawakami, A. and Christopher, D. A. (2001) 'Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves', *Plant Physiol*, 125(4), pp. 1957-66.
- Clough, R. C. and Vierstra, R. D. (1997) 'Phytochrome degradation', *Plant, Cell & Environment*, 20(6).
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998) 'Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*', *Plant J*, 16(6), pp. 735-43.
- Consortium, U. (2012) 'Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)', *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), pp. D71-5
- Craggs, T. D. (2009) 'Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation', *Chem Soc Rev*, 38(10), pp. 2865-75.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K., Iwai, S., Todo, T. and Toh, H. (2004) 'Identification of cryptochrome DASH from vertebrates.', *Genes Cells*, 9(5), pp. 479-95.
- De Brouwer, V., Zhang, G.-F., Storozhenko, S., Van Der Straeten, D. and Lambert, W. E. (2007) 'pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates', *Phytochemical Analysis*, 18(6), pp. 496-508.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J. (1993) 'The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit', *Genes Dev*, 7(4), pp. 555-69.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) 'A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis', *Nucleic Acids Res*, 19(6), pp. 1349.
- Efimova, M. V., Karnachuk, R. A., Kusnetsov, V. V. and Kuznetsov, V. V. (2013) 'Green light regulates plastid gene transcription and stimulates the accumulation of photosynthetic pigments in plants', *Dokl Biol Sci*, 451, pp. 253-6.
- Evans, E. W., Dodson, C. A., Maeda, K., Biskup, T., Wedge, C. J. and Timmel, C. R. (2013) 'Magnetic field effects in flavoproteins and related systems', *Interface Focus*, 3(5), pp. 20130037.
- Fancy, N. N., Bahlmann, A. K. and Loake, G. J. (2017) 'Nitric oxide function in plant abiotic stress', *Plant Cell Environ*, 40(4), pp. 462-472
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M. (1989) 'Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules', *Science*, 246(4926), pp. 64-71.
- Fields, S. and Song, O. (1989) 'A novel genetic system to detect protein-protein interactions', *Nature*, 340(6230), pp. 245-6.
- Figueroa, C. M. and Lunn, J. E. (2016) 'A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose', *Plant Physiol*, 172(1), pp. 7-27.
- Fiserova, J., Kiseleva, E. and Goldberg, M. W. (2009) 'Nuclear envelope and nuclear pore complex structure and organization in tobacco BY-2 cells', *Plant J*, 59(2), pp. 243-55.
- Folta, K. M. and Maruhnich, S. A. (2007) 'Green light: a signal to slow down or stop.', *J Exp Bot*, 58(12), pp. 3099-111.
- Franklin, K. A. and Quail, P. H. (2010) 'Phytochrome functions in *Arabidopsis* development', *J Exp Bot*, 61(1), pp. 11-24.
- Franklin, K. A. and Whitelam, G. C. (2007) 'Phytochrome a function in red light sensing', *Plant Signal Behav*, 2(5), pp. 383-5.

- Free, R. B., Hazelwood, L. A. and Sibley, D. R. (2009) 'Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy', *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 5, pp. Unit 5.28.
- Friedman, D. B., Hoving, S. and Westermeier, R. (2009) 'Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis.', *Methods Enzymol*, 463, pp. 515-40.
- Froehlich, A. C., Chen, C. H., Belden, W. J., Madeti, C., Roenneberg, T., Merrow, M., Loros, J. J. and Dunlap, J. C. (2010) 'Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*', *Eukaryot Cell*, 9(5), pp. 738-50.
- Ghedira, R., De Buck, S., Nolf, J. and Depicker, A. (2013) 'The efficiency of *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation is determined not only by the *Agrobacterium* strain used but also by the physiology and the ecotype of the dipped plant', *Mol Plant Microbe Interact*, 26(7), pp. 823-32.
- Gimpl, K., Klement, J. and Keller, S. (2016) 'Characterising protein/detergent complexes by triple-detection size-exclusion chromatography', *Biol Proced Online*, 18, pp. 4.
- Gindt, Y. M., Messyas, A. and Jumbo, P. I. (2015) 'Binding of Substrate Locks the Electrochemistry of CRY-DASH into DNA Repair', *Biochemistry*, 54(18), pp. 2802-5.
- Graciet, E., Lebreton, S. and Gontero, B. (2004) 'Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex', *J Exp Bot*, 55(400), pp. 1245-54.
- Göbel, T. 2011. Vergleichende Analyse der Chloroplasten Proteome von *Arabidopsis* Wildtyp und Cryptochrome 3 Mutante. Masterarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J. R., Hanash, S. M. and Somerlot, L. (1987) 'Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer', *ELECTROPHORESIS*, 8(2), pp. 122-124.
- Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J. (2004) 'Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.', *Proteomics*, 4(12), pp. 3665-85.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T. C. and Lin, C. (1998) 'Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors', *Science*, 279(5355), pp. 1360-3.
- Hall, M., Mata-Cabana, A., Akerlund, H. E., Florencio, F. J., Schröder, W. P., Lindahl, M. and Kieselbach, T. (2010) 'Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function', *Proteomics*, 10(5), pp. 987-1001.
- Hamann, F. (2014), 'Analyse der Wirkung von Blaulicht auf die Genexpression von Cryptochrom3 aus *Arabidopsis thaliana*' Bachelorarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps Universität Marburg
- Hamm-Alvarez, S., Sancar, A. and Rajagopalan, K. V. (1989) 'Role of enzyme-bound 5,10-methenyltetrahydropteroylpolyglutamate in catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase', *J Biol Chem*, 264(16), pp. 9649-56.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993) 'The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases', *Cell*, 75(4), pp. 805-16.
- He, Y., Wang, R., Dai, X. and Zhao, Y. (2017) 'On Improving CRISPR for Editing Plant Genes: Ribozyme-Mediated Guide RNA Production and Fluorescence-Based Technology for Isolating Transgene-Free Mutants Generated by CRISPR', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 149, pp. 151-166.
- Heijde, M., Zabulon, G., Corellou, F., Ishikawa, T., Brazard, J., Usman, A., Sanchez, F., Plaza, P., Martin, M., Falciatore, A., Todo, T., Bouget, F. Y. and Bowler, C. (2010) 'Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes.', *Plant Cell Environ*, 33(10), pp. 1614-26.

- Heilmann, M., Velanis, C. N., Cloix, C., Smith, B. O., Christie, J. M. and Jenkins, G. I. (2016) 'Dimer/monomer status and in vivo function of salt-bridge mutants of the plant UV-B photoreceptor UVR8', *Plant J*, 88(1), pp. 71-81.
- Hendrischk, A. K., Fröhlich, S. W., Moldt, J., Pokorny, R., Metz, S., Kaiser, G., Jäger, A., Batschauer, A. and Klug, G. (2009) 'A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*', *Mol Microbiol*, 74(4), pp. 990-1003.
- Herbel, V., Orth, C., Wenzel, R., Ahmad, M., Bittl, R. and Batschauer, A. (2013) 'Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states in vivo', *Plant J*, 74(4), pp. 583-92.
- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczián, A., Kunkel, T., Kircher, S. and Schäfer, E. (2006) 'FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor', *Plant Cell Physiol*, 47(8), pp. 1023-34.
- Hiltbrunner, A., Viczián, A., Bury, E., Tscheuschler, A., Kircher, S., Tóth, R., Honsberger, A., Nagy, F., Fankhauser, C. and Schäfer, E. (2005) 'Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1', *Curr Biol*, 15(23), pp. 2125-30.
- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. and Todo, T. (2000) 'Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803', *Nucleic Acids Res*, 28(12), pp. 2353-62.
- Hoang, Q. T. N., Han, Y. J. and Kim, J. I. (2019) 'Plant Phytochromes and their Phosphorylation', *Int J Mol Sci*, 20(14).
- Holzmeister, C., Fröhlich, A., Sarioglu, H., Bauer, N., Durner, J. and Lindermayr, C. (2011) 'Proteomic analysis of defense response of wildtype Arabidopsis thaliana and plants with impaired NO-homeostasis', *Proteomics*, 11(9), pp. 1664-83.
- Hortin, G. L. (2006) 'The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome.', *Clin Chem*, 52(7), pp. 1223-37.
- Hurkman, W. J. and Tanaka, C. K. (1986) 'Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis.', *Plant Physiol*, 81(3), pp. 802-6.
- Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Correa-Aragunde, N., Colman, S. L., Izquierdo-Álvarez, A., Fiol, D. F., París, R., Sánchez-López, N., Marina, A., Calderón Villalobos, L. I. A., Estelle, M., Lamattina, L., Martínez-Ruiz, A. and Casalagué, C. A. (2018) 'Regulation of SCF', *Redox Biol*, 18, pp. 200-210.
- Inaba, J., Kim, B. M., Shimura, H. and Masuta, C. (2011) 'Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA-silencing suppressor and a host catalase', *Plant Physiol*, 156(4), pp. 2026-36.
- Islam, S. D. M., Susdorf, T., Penzkofer, A. and Hegemann, P. (2003) 'Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer', *Chemical Physics*, 295(2), pp. 137-149.
- Ito, S., Song, Y. H. and Imaizumi, T. (2012) 'LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis', *Mol Plant*, 5(3), pp. 573-82.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. and Fields, S. (1993) 'Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization', *Oncogene*, 8(6), pp. 1693-6.
- Jabrin, S., Ravanel, S., Gambonnet, B., Douce, R. and Rébeillé, F. (2003) 'One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development.', *Plant Physiol*, 131(3), pp. 1431-9.
- Jackowski, G., Kacprzak, K. and Jansson, S. (2001) 'Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II).', *Biochim Biophys Acta*, 1504(2-3), pp. 340-5.

- Jaedicke, K., Lichtenthäler, A. L., Meyberg, R., Zeidler, M. and Hughes, J. (2012) 'A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(30), pp. 12231-6.
- Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V. and Aro, E. M. (2011) 'Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes.', *Biochem J*, 439(2), pp. 207-14.
- James, A. B., Monreal, J. A., Nimmo, G. A., Kelly, C. L., Herzyk, P., Jenkins, G. I. and Nimmo, H. G. (2008) 'The circadian clock in Arabidopsis roots is a simplified slave version of the clock in shoots', *Science*, 322(5909), pp. 1832-5.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A. (1996) 'Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast', *Genetics*, 144(4), pp. 1425-36.
- Jardine, D. R., Morgan, J., Alderdice, D. S. and Derrick, P. J. (1992) 'A tandem time-of-flight mass spectrometer', *Organic Mass Spectrometry*, 27(10), pp. 1077-1083.
- Jenkins, G. I. (2014) 'Structure and function of the UV-B photoreceptor UVR8', *Curr Opin Struct Biol*, 29, pp. 52-7.
- Jiang, W., Yang, B. and Weeks, D. P. (2014) 'Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Arabidopsis thaliana and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations', *PLoS One*, 9(6), pp. e99225.
- Kao, Y. T., Tan, C., Song, S. H., Oztürk, N., Li, J., Wang, L., Sancar, A. and Zhong, D. (2008) 'Ultrafast dynamics and anionic active states of the flavin cofactor in cryptochrome and photolyase', *J Am Chem Soc*, 130(24), pp. 7695-701.
- Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) 'Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.', *Anal Chem*, 60(20), pp. 2299-301.
- Kasahara, M., Swartz, T. E., Olney, M. A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J. M., Nagatani, A. and Briggs, W. R. (2002) 'Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from Arabidopsis, rice, and Chlamydomonas reinhardtii', *Plant Physiol*, 129(2), pp. 762-73.
- Kendrick, R. E. and Cone, J. W. (1985) 'Biphasic fluence response curves for induction of seed germination', *Plant Physiol*, 79(1), pp. 299-300.
- Kennedy, M. J., Hughes, R. M., Peteya, L. A., Schwartz, J. W., Ehlers, M. D. and Tucker, C. L. (2010) 'Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells', *Nat Methods*, 7(12), pp. 973-5.
- Kikis, E. A., Oka, Y., Hudson, M. E., Nagatani, A. and Quail, P. H. (2009) 'Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3', *PLoS Genet*, 5(1), pp. e1000352.
- Klar, T., Kaiser, G., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. and Essen, L. O. (2006) 'Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from Thermus thermophilus.', *Chembiochem*, 7(11), pp. 1798-806.
- Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A. and Essen, L. O. (2007) 'Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna.', *J Mol Biol*, 366(3), pp. 954-64.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W. and Baginsky, S. (2004) 'The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions', *Curr Biol*, 14(5), pp. 354-62.
- Kleine, T., Lockhart, P. and Batschauer, A. (2003) 'An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles.', *Plant J*, 35(1), pp. 93-103.

- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K. and Batschauer, A. (1999) 'Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2', *Plant J*, 19(3), pp. 289-96.
- Kley, J., Heil, M., Muck, A., Svatos, A. and Boland, W. (2010) 'Isolating intact chloroplasts from small Arabidopsis samples for proteomic studies.', *Anal Biochem*, 398(2), pp. 198-202.
- Koncz, C., Németh, K., Rédei, G. P. and Schell, J. (1992) 'T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis', *Plant Mol Biol*, 20(5), pp. 963-76.
- Kong, S. G., Suetsugu, N., Kikuchi, S., Nakai, M., Nagatani, A. and Wada, M. (2013) 'Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity', *Plant Cell Physiol*, 54(1), pp. 80-92.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J. and van der Veen, J. H. (1991) 'A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana', *Mol Gen Genet*, 229(1), pp. 57-66.
- Koornneef, M., Rolff, E. and Spruit, C. J. P. (1980) 'Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana (L.)', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 100 (1980) 147-160.
- Kunji, E. R., Harding, M., Butler, P. J. and Akamine, P. (2008) 'Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography', *Methods*, 46(2), pp. 62-72.
- Labade, A. S., Karmodiya, K. and Sengupta, K. (2016) 'HOXA repression is mediated by nucleoporin Nup93 assisted by its interactors Nup188 and Nup205', *Epigenetics Chromatin*, 9, pp. 54.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Lagarias, J. C. and Rapoport, H. (1980) 'Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the PR form of the phytochrome chromophore', *Journal of the American Chemical Society*, 102(14), pp. 4821-4828.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C. H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A. and Huala, E. (2012) 'The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools', *Nucleic Acids Res*, 40(Database issue), pp. D1202-10.
- Langenbacher, T., Immeln, D., Dick, B. and Kottke, T. (2009) 'Microsecond light-induced proton transfer to flavin in the blue light sensor plant cryptochrome', *J Am Chem Soc*, 131(40), pp. 14274-80.
- Lau, K., Podolec, R., Chappuis, R., Ulm, R. and Hothorn, M. (2019) 'Plant photoreceptors and their signaling components compete for COP1 binding via VP peptide motifs', *EMBO J*, 38(18), pp. e102140.
- Lee, T. A., Vande Wetering, S. W. and Brusslan, J. A. (2013) 'Stromal protein degradation is incomplete in Arabidopsis thaliana autophagy mutants undergoing natural senescence', *BMC Res Notes*, 6, pp. 17.
- Lee, Z. H., Yamaguchi, N. and Ito, T. (2018) 'Using CRISPR/Cas9 System to Introduce Targeted Mutation in Arabidopsis', *Methods Mol Biol*, 1830, pp. 93-108.
- Legris, M., Ince, Y. and Fankhauser, C. (2019) 'Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants', *Nat Commun*, 10(1), pp. 5219.
- Leivar, P. and Monte, E. (2014) 'PIFs: systems integrators in plant development', *Plant Cell*, 26(1), pp. 56-78.
- Lemaire, S. D., Stein, M., Issakidis-Bourguet, E., Keryer, E., Benoit, V., Pineau, B., Gérard-Hirne, C., Miginiac-Maslow, M. and Jacquot, J. P. (1999) 'The complex regulation of ferredoxin/thioredoxin-related genes by light and the circadian clock', *Planta*, 209(2), pp. 221-229.

- Li, B. and Fields, S. (1993) 'Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system', *FASEB J*, 7(10), pp. 957-63.
- Lin, C. and Shalitin, D. (2003) 'Cryptochrome structure and signal transduction.', *Annu Rev Plant Biol*, 54, pp. 469-96.
- Lin, M. C., Tsai, H. L., Lim, S. L., Jeng, S. T. and Wu, S. H. (2017) 'Unraveling multifaceted contributions of small regulatory RNAs to photomorphogenic development in Arabidopsis', *BMC Genomics*, 18(1), pp. 559.
- Liu, B., Liu, H., Zhong, D. and Lin, C. (2010) 'Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors', *Curr Opin Plant Biol*, 13(5), pp. 578-86.
- Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X. and Lin, C. (2011a) 'Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light.', *Genes Dev*, 25(10), pp. 1029-34.
- Liu, B., Yang, Z., Gomez, A., Lin, C. and Oka, Y. (2016) 'Signaling mechanisms of plant cryptochromes in Arabidopsis thaliana', *J Plant Res*, 129(2), pp. 137-48.
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M. and Lin, C. (2011b) 'The action mechanisms of plant cryptochromes', *Trends Plant Sci*, 16(12), pp. 684-91.
- Liu, H., Wang, Q., Liu, Y., Zhao, X., Imaizumi, T., Somers, D. E., Tobin, E. M. and Lin, C. (2013) 'Arabidopsis CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(43), pp. 17582-7.
- Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D. and Lin, C. (2008) 'Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis', *Science*, 322(5907), pp. 1535-9.
- Liu, Q., Su, T., He, W., Ren, H., Liu, S., Chen, Y., Gao, L., Hu, X., Lu, H., Cao, S., Huang, Y., Wang, X., Wang, Q. and Lin, C. (2020) 'Photooligomerization determines photosensitivity and photoreactivity of plant cryptochromes', *Mol Plant*.
- Liu, Z., Taub, C. C. and McClung, C. R. (1996) 'Identification of an Arabidopsis thaliana ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase (RCA) minimal promoter regulated by light and the circadian clock', *Plant Physiol*, 112(1), pp. 43-51.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. and Chang, W. (2004) 'Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution.', *Nature*, 428(6980), pp. 287-92.
- López-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S. M., Murray, J. A., Beemster, G. T., Bögre, L. and Shanahan, H. (2008) 'Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of Arabidopsis', *Plant Cell*, 20(4), pp. 947-68.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, X. W. (2001) 'Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways.', *Plant Cell*, 13(12), pp. 2589-607.
- Mannick, J. B. and Schonhoff, C. M. (2004) 'NO means no and yes: regulation of cell signaling by protein nitrosylation', *Free Radic Res*, 38(1), pp. 1-7.
- Marchand, C., Le Maréchal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. and Decottignies, P. (2004) 'New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis', *Proteomics*, 4(9), pp. 2696-706.
- Marri, L., Sparla, F., Pupillo, P. and Trost, P. (2005) 'Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in Arabidopsis thaliana', *J Exp Bot*, 56(409), pp. 73-80.

- Mateos, J. L., Luppi, J. P., Ogorodnikova, O. B., Sineshchekov, V. A., Yanovsky, M. J., Braslavsky, S. E., Gärtner, W. and Casal, J. J. (2006) 'Functional and Biochemical Analysis of the N-terminal Domain of Phytochrome A', *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), pp. 34421-34429.
- Matsunaga, W., Shimura, H., Shirakawa, S., Isoda, R., Inukai, T., Matsumura, T. and Masuta, C. (2019) 'Transcriptional silencing of 35S driven-transgene is differentially determined depending on promoter methylation heterogeneity at specific cytosines in both plus- and minus-sense strands', *BMC Plant Biol*, 19(1), pp. 24.
- Medvedev, D. and Stuchebrukhov, A. A. (2001) 'DNA repair mechanism by photolyase: electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH(-) to DNA thymine dimer', *J Theor Biol*, 210(2), pp. 237-48.
- Mei, Q. and Dvornyk, V. (2015) 'Evolutionary History of the Photolyase/Cryptochrome Superfamily in Eukaryotes', *PLoS One*, 10(9), pp. e0135940.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A. and Ram, A. F. (2008) 'Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*', *Nat Protoc*, 3(10), pp. 1671-8.
- Migicovsky, Z. and Kovalchuk, I. (2013) 'Changes to DNA methylation and homologous recombination frequency in the progeny of stressed plants', *Biochem Cell Biol*, 91(1), pp. 1-5.
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J., Gao, Z., Mgutshini, N. L., Li, J., Chen, X., Bowman, L. H. and Vance, V. (2010) 'Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing', *Plant J*, 64(4), pp. 699-704.
- Moldt, J., Pokorny, R., Orth, C., Linne, U., Geisselbrecht, Y., Marahiel, M. A., Essen, L. O. and Batschauer, A. (2009) 'Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family.', *J Biol Chem*, 284(32), pp. 21670-83.
- Mombaerts, L., Carignano, A., Robertson, F. C., Hearn, T. J., Junyang, J., Hayden, D., Rutterford, Z., Hotta, C. T., Hubbard, K. E., Maria, M. R. C., Yuan, Y., Hannah, M. A., Goncalves, J. and Webb, A. A. R. (2019) 'Dynamical differential expression (DyDE) reveals the period control mechanisms of the Arabidopsis circadian oscillator', *PLoS Comput Biol*, 15(1), pp. e1006674.
- Monte, E., Tepperman, J. M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K. A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Li, X., Zhang, Y. and Quail, P. H. (2004) 'The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(46), pp. 16091-8.
- Moon, Y. J., Kim, S. J., Park, Y. M. and Chung, Y. H. (2010) 'Sensing UV/blue: pterin as a UV-A absorbing chromophore of cryptochrome', *Plant Signal Behav*, 5(9), pp. 1127-30.
- Motchoulski, A. and Liscum, E. (1999) 'Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism', *Science*, 286(5441), pp. 961-4.
- Nebel, S. (2012), 'Untersuchung zur Wirkung von Cryptochrom 3 auf die Genexpression in Arabidopsis thaliana' Masterarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps Universität Marburg
- O'Farrell, P. H. (1975) 'High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.', *J Biol Chem*, 250(10), pp. 4007-21.
- Oberpichler, I., Pierik, A. J., Wesslowski, J., Pokorny, R., Rosen, R., Vugman, M., Zhang, F., Neubauer, O., Ron, E. Z., Batschauer, A. and Lamparter, T. (2011) 'A photolyase-like protein from *Agrobacterium tumefaciens* with an iron-sulfur cluster', *PLoS One*, 6(10), pp. e26775.
- Oh, E., Kang, H., Yamaguchi, S., Park, J., Lee, D., Kamiya, Y. and Choi, G. (2009) 'Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis', *Plant Cell*, 21(2), pp. 403-19.

- Oliveira, I. C. and Coruzzi, G. M. (1999) 'Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis.', *Plant Physiol*, 121(1), pp. 301-10.
- Oztürk, N., Kao, Y. T., Selby, C. P., Kavakli, I. H., Partch, C. L., Zhong, D. and Sancar, A. (2008) 'Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*.' *Biochemistry*, 47(39), pp. 10255-61.
- Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Zhang, Y. and Quail, P. H. (2014) 'Combinatorial complexity in a transcriptionally centered signaling hub in Arabidopsis', *Mol Plant*, 7(11), pp. 1598-1618.
- Plaxton, W. C. (1996) 'THE ORGANIZATION AND REGULATION OF PLANT GLYCOLYSIS', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, pp. 185-214.
- Pokorny, R., Klar, T., Essen, L. O. and Batschauer, A. (2005) 'Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*', *Acta Crystallogr SECT F Struct Biol Cryst Commun*, 61(Pt 10), pp. 935-8.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. and Essen, L. O. (2008) 'Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), pp. 21023-7.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S. and Matthies, H. (1975) '[Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates].', *Acta Biol Med Ger*, 34(9), pp. 1441-6.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. (1989) 'Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), pp. 384-394.
- Porecha, R. and Herschlag, D. (2013) 'RNA radiolabeling', *Methods Enzymol*, 530, pp. 255-79.
- Quinlivan, E. P., Hanson, A. D. and Gregory, J. F. (2006) 'The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples', *Anal Biochem*, 348(2), pp. 163-84.
- Rausenberger, J., Tscheuschler, A., Nordmeier, W., Wüst, F., Timmer, J., Schäfer, E., Fleck, C. and Hiltbrunner, A. (2011) 'Photoconversion and nuclear trafficking cycles determine phytochrome A's response profile to far-red light', *Cell*, 146(5), pp. 813-25.
- Ravanel, S., Droux, M. and Douce, R. (1995) 'Methionine biosynthesis in higher plants. I. Purification and characterization of cystathionine gamma-synthase from spinach chloroplasts.', *Arch Biochem Biophys*, 316(1), pp. 572-84.
- Raven, J. A. (2013) 'Rubisco: still the most abundant protein of Earth?', *New Phytol*, 198(1), pp. 1-3.
- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W. and Baginsky, S. (2009) 'Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks', *Plant Physiol*, 150(2), pp. 889-903.
- Reisbacher, S. 2009. Funktionelle Analyse von Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation am Fachbereich für Biologie der Phillips-Universität Marburg.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R. (1979) 'Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), pp. 3116-20.
- Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I. and Ulm, R. (2011) 'Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein.', *Science*, 332(6025), pp. 103-6.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S. and Lagarias, J. C. (2006) 'Phytochrome structure and signaling mechanisms.', *Annu Rev Plant Biol*, 57, pp. 837-58.

- Rode, C., Winkelmann, T., Braun, H. P. and Colditz, F. (2012) 'DIGE analysis of plant tissue proteomes using a phenolic protein extraction method.', *Methods Mol Biol*, 854, pp. 335-42.
- Romero-Puertas, M. C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P. G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P. and Delledonne, M. (2008) 'Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response', *Proteomics*, 8(7), pp. 1459-69.
- Ruzanski, C., Smirnova, J., Rejzek, M., Cockburn, D., Pedersen, H. L., Pike, M., Willats, W. G., Svensson, B., Steup, M., Ebenhöf, O., Smith, A. M. and Field, R. A. (2013) 'A bacterial glucanotransferase can replace the complex maltose metabolism required for starch to sucrose conversion in leaves at night', *J Biol Chem*, 288(40), pp. 28581-98.
- Rébeillé, F., Ravanel, S., Jabrin, S., Douce, R., Storozhenko, S. and Van Der Straeten, D. (2006) 'Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement', *Physiologia Plantarum*, 126(3), pp. 330-342.
- Rosenfeldt, G., Viana, R. M., Mootz, H. D., von Arnim, A. G. and Batschauer, A. (2008) 'Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation', *Mol Plant*, 1(1), pp. 4-14.
- Ruzanski, C., Smirnova, J., Rejzek, M., Cockburn, D., Pedersen, H. L., Pike, M., Willats, W. G., Svensson, B., Steup, M., Ebenhöf, O., Smith, A. M. and Field, R. A. (2013) 'A bacterial glucanotransferase can replace the complex maltose metabolism required for starch to sucrose conversion in leaves at night', *J Biol Chem*, 288(40), pp. 28581-98.
- Rösler, J., Klein, I. and Zeidler, M. (2007) 'Arabidopsis fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(25), pp. 10737-42.
- Saijo, Y., Zhu, D., Li, J., Rubio, V., Zhou, Z., Shen, Y., Hoecker, U., Wang, H. and Deng, X. W. (2008) 'Arabidopsis COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling', *Mol Cell*, 31(4), pp. 607-13.
- Sakr, S., Wang, M., Dédaldéchamp, F., Perez-Garcia, M. D., Ogé, L., Hamama, L. and Atanassova, R. (2018) 'The Sugar-Signaling Hub: Overview of Regulators and Interaction with the Hormonal and Metabolic Network', *Int J Mol Sci*, 19(9).
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U. and Briggs, W. R. (2000) 'Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin', *Biochemistry*, 39(31), pp. 9401-10.
- Sancar, A. (2003) 'Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.', *Chem Rev*, 103(6), pp. 2203-37.
- Sang, Y., Li, Q. H., Rubio, V., Zhang, Y. C., Mao, J., Deng, X. W. and Yang, H. Q. (2005) 'N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1', *Plant Cell*, 17(5), pp. 1569-84.
- Schelvis, J. P. and Gindt, Y. M. (2017) 'A Review of Spectroscopic and Biophysical-Chemical Studies of the Complex of Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase and Cryptochrome DASH with Substrate DNA', *Photochem Photobiol*, 93(1), pp. 26-36.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method', *Nat Protoc*, 3(6), pp. 1101-8.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nat Methods*, 9(7), pp. 671-5.
- Selby, C. P. and Sancar, A. (2006) 'A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(47), pp. 17696-700.
- Sellaro, R., Crepy, M., Trupkin, S. A., Karayekov, E., Buchovsky, A. S., Rossi, C. and Casal, J. J. (2010) 'Cryptochrome as a sensor of the blue/green ratio of natural radiation in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 154(1), pp. 401-9.

- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y. (2005) 'A guide to choosing fluorescent proteins', *Nat Methods*, 2(12), pp. 905-9.
- Sharrock, R. A. and Quail, P. H. (1989) 'Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family', *Genes Dev*, 3(11), pp. 1745-57.
- Sheffield, L. G. and Gavinski, J. J. (2003) 'Proteomics methods for probing molecular mechanisms in signal transduction.', *J Anim Sci*, 81 Suppl 3, pp. 48-57.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M. and Kinoshita, T. (2007) 'Light regulation of stomatal movement', *Annu Rev Plant Biol*, 58, pp. 219-47.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M. and Furuya, M. (1996) 'Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(15), pp. 8129-33.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G. (2011) 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega', *Mol Syst Biol*, 7, pp. 539.
- Sommer, J. 2010. Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom 3. Dissertation am Fachbereich für Biologie der Phillips-Universität Marburg.
- Song, S. H., Dick, B., Penzkofer, A., Pokorny, R., Batschauer, A. and Essen, L. O. (2006) 'Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*.', *J Photochem Photobiol B*, 85(1), pp. 1-16.
- Sullivan, S., Thomson, C. E., Lamont, D. J., Jones, M. A. and Christie, J. M. (2008) 'In vivo phosphorylation site mapping and functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1', *Mol Plant*, 1(1), pp. 178-94.
- Sun, Z., Li, M., Zhou, Y., Guo, T., Liu, Y., Zhang, H. and Fang, Y. (2018) 'Coordinated regulation of *Arabidopsis* microRNA biogenesis and red light signaling through Dicer-like 1 and phytochrome-interacting factor 4', *PLoS Genet*, 14(3), pp. e1007247.
- Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. and Bogomolni, R. A. (2001) 'The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin', *J Biol Chem*, 276(39), pp. 36493-500.
- Sáez-Vásquez, J. and Delseny, M. (2019) 'Ribosome Biogenesis in Plants: From Functional 45S Ribosomal DNA Organization to Ribosome Assembly Factors', *Plant Cell*, 31(9), pp. 1945-1967.
- Tagua, V. G., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A. P., Pokorny, R., Corrochano, L. M. and Batschauer, A. (2015) 'Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(49), pp. 15130-5.
- Takase, T., Nishiyama, Y., Tanihigashi, H., Ogura, Y., Miyazaki, Y., Yamada, Y. and Kiyosue, T. (2011) 'LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1', *Plant J*, 67(4), pp. 608-21.
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J. M. and Shimazaki, K. (2013) 'Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening', *Nat Commun*, 4, pp. 2094.
- Talamond, P., Verdeil, J. L. and Conéjéro, G. (2015) 'SECondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells', *Molecules*, 20(3), pp. 5024-37.
- Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T. and Hara-Nishimura, I. (2010) 'Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell*, 22(12), pp. 4084-97.

- Tamura, K. and Hara-Nishimura, I. (2013) 'The molecular architecture of the plant nuclear pore complex', *J Exp Bot*, 64(4), pp. 823-32.
- Tan, S. T., Dai, C., Liu, H. T. and Xue, H. W. (2013) 'Arabidopsis casein kinase1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling', *Plant Cell*, 25(7), pp. 2618-32.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. and Matsuo, T. (1988) 'Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry', 2(8), pp. 151-153.
- Tepperman, J. M., Hwang, Y. S. and Quail, P. H. (2006) 'phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation', *Plant J*, 48(5), pp. 728-42.
- Thines, B. and Harmon, F. G. (2010) 'Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core Arabidopsis circadian clock', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7), pp. 3257-62.
- Thoma, F. (1999) 'Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair', *EMBO J*, 18(23), pp. 6585-98.
- Timney, B. L., Raveh, B., Mironska, R., Trivedi, J. M., Kim, S. J., Russel, D., Went, S. R., Sali, A. and Rout, M. P. (2016) 'Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex', *J Cell Biol*, 215(1), pp. 57-76.
- Tognetti, J. A., Pontis, H. G. and Martínez-Noël, G. M. (2013) 'Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored', *Plant Signal Behav*, 8(3), pp. e23316.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), pp. 4350-4.
- Tripathi, S., Hoang, Q. T. N., Han, Y. J. and Kim, J. I. (2019) 'Regulation of Photomorphogenic Development by Plant Phytochromes', *Int J Mol Sci*, 20(24).
- Tsien, R. Y. (1998) 'The green fluorescent protein', *Annu Rev Biochem*, 67, pp. 509-44.
- Tyagi, A., Penzkofer, A., Batschauer, A. and Wolf, E. (2009) 'Fluorescence behaviour of 5,10-methenyltetrahydrofolate, 10-formyltetrahydrofolate, 10-formyldihydrofolate, and 10-formylfolate in aqueous solution at pH 8', *Chemical Physics*, 361(1-2), pp. 75-82.
- Ulijasz, A. T. and Vierstra, R. D. (2011) 'Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture', *Curr Opin Plant Biol*, 14(5), pp. 498-506.
- Ułaszewski, S., Mamounas, T., Shen, W. K., Rosenthal, P. J., Woodward, J. R., Cirillo, V. P. and Edmunds, L. N. (1979) 'Light effects in yeast: evidence for participation of cytochromes in photoinhibition of growth and transport in *Saccharomyces cerevisiae* cultured at low temperatures', *J Bacteriol*, 138(2), pp. 523-9.
- Vaseghi, M. J., Chibani, K., Telman, W., Liebthal, M. F., Gerken, M., Schnitzer, H., Mueller, S. M. and Dietz, K. J. (2018) 'The chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin functions as thioredoxin oxidase in redox regulation of chloroplast metabolism', *Elife*, 7.
- Vass, I. Z., Kós, P. B., Knoppová, J., Komenda, J. and Vass, I. (2014) 'The cry-DASH cryptochrome encoded by the *sll1629* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 is required for Photosystem II repair', *J Photochem Photobiol B*, 130, pp. 318-26.
- Vierstra, R. D. (1993) 'Illuminating Phytochrome Functions (There Is Light at the End of the Tunnel)', *Plant Physiol*, 103(3), pp. 679-684.
- Vierstra, R. D. and Quail, P. H. (1983) 'Photochemistry of 124 kilodalton *Avena* phytochrome in vitro', *Plant Physiol*, 72(1), pp. 264-7.

- Vierstra, R. D. and Zhang, J. (2011) 'Phytochrome signaling: solving the Gordian knot with microbial relatives', *Trends Plant Sci*, 16(8), pp. 417-26.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) 'An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus', *Plant J*, 33(5), pp. 949-56.
- von Horsten, S., Straß, S., Hellwig, N., Gruth, V., Klasen, R., Mielcarek, A., Linne, U., Morgner, N. and Essen, L. O. (2016) 'Mapping light-driven conformational changes within the photosensory module of plant phytochrome B', *Sci Rep*, 6, pp. 34366.
- Wachter, R. M. and Remington, S. J. (1999) 'Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate', *Curr Biol*, 9(17), pp. R628-9.
- Walker, D. A. (1965) 'Correlation between Photosynthetic Activity and Membrane Integrity in Isolated Pea Chloroplasts.', *Plant Physiol*, 40(6), pp. 1157-61.
- Wally, O., Jayaraj, J. and Punja, Z. K. (2008) 'Comparative expression of beta-glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues', *Plant Cell Rep*, 27(2), pp. 279-87.
- Wang, H., Ma, L. G., Li, J. M., Zhao, H. Y. and Deng, X. W. (2001) 'Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development.', *Science*, 294(5540), pp. 154-8.
- Wang, Q. and Lin, C. (2019) 'Photoreceptor signaling: when COP1 meets VPs', *EMBO J*, 38(18), pp. e102962.
- Wang, Q., Liu, Q., Wang, X., Zuo, Z., Oka, Y. and Lin, C. (2018a) 'New insights into the mechanisms of phytochrome-cryptochrome coaction', *New Phytol*, 217(2), pp. 547-551.
- Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Liu, Q., Gu, L., Oka, Y. and Lin, C. (2018b) 'Beyond the photocycle-how cryptochromes regulate photoresponses in plants?', *Curr Opin Plant Biol*, 45(Pt A), pp. 120-126.
- Wang, X., Wang, Q., Han, Y. J., Liu, Q., Gu, L., Yang, Z., Su, J., Liu, B., Zuo, Z., He, W., Wang, J., Matsui, M., Kim, J. I., Oka, Y. and Lin, C. (2017) 'A CRY-BIC negative-feedback circuitry regulating blue light sensitivity of Arabidopsis', *Plant J*, 92(3), pp. 426-436.
- Wang, Y. and Folta, K. M. (2013) 'Contributions of green light to plant growth and development', *Am J Bot*, 100(1), pp. 70-8.
- Waters, M. T. and Langdale, J. A. (2009) 'The making of a chloroplast.', *EMBO J*, 28(19), pp. 2861-73.
- Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X. and Liu, Z. (2016) 'Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution', *Nature*, 534(7605), pp. 69-74.
- Weidler, G., Zur Oven-Krockhaus, S., Heunemann, M., Orth, C., Schleifenbaum, F., Harter, K., Hoecker, U. and Batschauer, A. (2012) 'Degradation of Arabidopsis CRY2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A', *Plant Cell*, 24(6), pp. 2610-23.
- Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bondo, B. E. and Sancar, A. (2003) 'Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*.', *J Biol Chem*, 278(40), pp. 39143-54.
- Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., Zhang, J., Yang, P., Deng, H., Wang, J., Deng, X. and Shi, Y. (2012) 'Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8', *Nature*, 484(7393), pp. 214-9.
- Wu, G. and Spalding, E. P. (2007) 'Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47), pp. 18813-8.
- Xu, D. (2019) 'COP1 and BBXs-HY5-mediated light signal transduction in plants', *New Phytol*.

- Yang, E. J., Yoo, C. Y., Liu, J., Wang, H., Cao, J., Li, F. W., Pryer, K. M., Sun, T. P., Weigel, D., Zhou, P. and Chen, M. (2019) 'NCP activates chloroplast transcription by controlling phytochrome-dependent dual nuclear and plastidial switches', *Nat Commun*, 10(1), pp. 2630.
- Yang, H. Q., Tang, R. H. and Cashmore, A. R. (2001) 'The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1.', *Plant Cell*, 13(12), pp. 2573-87.
- Yang, H. Q., Wu, Y. J., Tang, R. H., Liu, D., Liu, Y. and Cashmore, A. R. (2000) 'The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response.', *Cell*, 103(5), pp. 815-27.
- Yang, X., Li, L., Wang, X., Yao, J. and Duan, D. (2020) 'Non-Coding RNAs Participate in the Regulation of', *Int J Mol Sci*, 21(1).
- Yoo, S. D., Cho, Y. H. and Sheen, J. (2007) 'Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis', *Nat Protoc*, 2(7), pp. 1565-72.
- Yoshida, K., Yokochi, Y. and Hisabori, T. (2019) 'New Light on Chloroplast Redox Regulation: Molecular Mechanism of Protein Thiol Oxidation', *Front Plant Sci*, 10, pp. 1534.
- Zhang, F., Scheerer, P., Oberpichler, I., Lamparter, T. and Krauß, N. (2013) 'Crystal structure of a prokaryotic (6-4) photolyase with an Fe-S cluster and a 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine antenna chromophore', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(18), pp. 7217-22.
- Zhang, J., Huang, D., Wang, C., Wang, B., Fang, H., Huo, J. and Liao, W. (2019) 'Recent Progress in Protein S-Nitrosylation in Phytohormone Signaling', *Plant Cell Physiol*, 60(3), pp. 494-502.
- Zirak, P., Penzkofer, A., Moldt, J., Pokorny, R., Batschauer, A. and Essen, L. O. (2009) 'Photocycle dynamics of the E149A mutant of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana.', *J Photochem Photobiol B*, 97(2), pp. 94-108.
- Zor, T. and Selinger, Z. (1996) 'Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.', *Anal Biochem*, 236(2), pp. 302-8.
- Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X. and Lin, C. (2011) 'Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis.', *Curr Biol*, 21(10), pp. 841-7.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Domänenstruktur von pflanzlichen Phytochromen.	4
Abbildung 1.2 vereinfachtes Schema der Phytochrom-vermittelten Photomorphogenese.	5
Abbildung 1.3 Domänenstruktur der Blaulichtrezeptoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Abbildung 1.4 Absorptionsspektren der unterschiedlichen Redoxzustände von Flavin.	10
Abbildung 1.5 vereinfachtes Schema der COP1-Regulation durch Photorezeptoren.	13
Abbildung 1.6 Die Rolle von NPH3 und RPT2 in der Signaltransduktion von phot1.	15
Abbildung 1.7 Frühe Signalweiterleitung in der Zeitlupe Familie.	17
Abbildung 1.8 Lichtreaktion in Photolyasen und Cryptochromen.	20
Abbildung 1.9 Kristallstruktur von Photolyasen und Cryptochromen.	22
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der verwendeten Y2H Plasmide.	50
Abbildung 3.1 Anti-GFP <i>Western blots</i> zeigen eine deutliche Anreicherung von cry3-GFP durch die Immunopräzipitation.	95
Abbildung 3.2 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der an cry3 gebundenen Kofaktoren.	98
Abbildung 3.3 HPLC Auftrennung der cry3-gebundenen Kofaktoren.	100
Abbildung 3.4 <i>Western blot</i> zeigt Expression von cry3-HA in <i>Arabidopsis</i>	103
Abbildung 3.5 Proteinmenge von cry3-HA während der Deetiolierung von Keimlingen.	105
Abbildung 3.6 Cry3-HA und cry3-GFP sind in Chloroplasten mittels <i>Western blot</i> nachweisbar.	106
Abbildung 3.7 SEC mit Detergenz zeigt zwei Peaks für cry3-HA.	108
Abbildung 3.8 SEC ohne Detergenz zeigt ein spezifisches Signal für cry3-HA im Bereich mit hohem Molekulargewicht.	110
Abbildung 3.9 Transient transformierte Protoplasten exprimieren cry3-GFP.	112
Abbildung 3.10 Cry3-YFP lokalisiert im Zellkern und den Chloroplasten von Tabak.	113
Abbildung 3.11 Blaulichtabhängige Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums.	115
Abbildung 3.12 Differentiell regulierte Spots in der cry3 Mutante.	117
Abbildung 3.13 Quantitative <i>Western blots</i> zeigen Einfluss von cry3 auf die Menge spezifischer Chloroplastenproteine.	121
Abbildung 3.14 Lichtabhängige Expression von RA und Pap1.	123
Abbildung 3.15 Quantitative <i>Western blots</i> zeigen veränderte Mengen an spezifischen Chloroplasten-proteinen in der cry3 Mutante, auch wenn in dieser cry3-HA exprimiert wird.	124
Abbildung 3.16 Die effektive Elution von cry3-HA und cry3-GFP in der CoIP gelingt nur mit SDS.	127

Abbildung 3.17. Cry3-GFP und cry3-HA können über ColPs deutlich angereichert werden.	129
Abbildung 3.18. <i>Western blots</i> zeigen die Expression des cry3 Fusionsproteins in Hefe.	133
Abbildung 3.19. Die Expression von cry3 beeinflusst das Hefewachstum nicht.	134
Abbildung 3.20 Hefewachstum auf unterschiedlichen Selektionsmedien.	135
Abbildung 4.1 Die Transiens der Induktion von <i>CRY3</i> ist Licht und Genotypabhängig.	150
Abbildung 4.2 Die Induktion von <i>CRY3</i> wird durch mehrere Photorezeptoren reguliert.	152
Abbildung 6.1 Hypokotyllängen gemessen von Maribel Dioniso-Sese.	173
Abbildung 6.2 Absolute und relative Hypokotyllängen von Keimlingen unterschiedlicher transgener Linien.	174
Abbildung 6.3 relative Hypokotyllänge von Col-0, GB#12 und <i>cry3</i> in Blaulicht und im Dunkeln.	175
Abbildung 6.4 Auftrennung von Chloroplastengesamtextrakten mittels 2D-DIGE.	176
Abbildung 6.5 DTT zeigt einen deutlichen Einfluss auf die Markierung mit CyDyes.	177
Abbildung 6.6 ESI-TOF Hits in cry3-HA.	178
Abbildung 6.7 ESI-TOF Hits in cry3-GFP.	179
Abbildung 6.8 ColP mit cry3-GFP zeigt keine Hinweise auf eine spezifische Bindung von Nukleinsäuren.	180
Abbildung 6.9 Alignments mit DPE12 und NUP205.	183

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 In der <i>cry3</i> Mutante differentiell exprimierte Proteine.	119
Tabelle 3.2 Proteine, die in den ColPs ausschließlich in Eluaten der cry3-GFP Linie gefunden wurden.	132
Tabelle 3.3. Inserts der Klone die im Y2H Screen auf Selektionsmedium wachsen.	136
Tabelle 6.1 Identifikation der in der <i>cry3</i> Mutante differentiell exprimierte Spots mittels MALDI- TOF.	184

Danksagungen

Besonders Danke ich Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, nicht nur für die Möglichkeit meine Arbeit bei ihm anzufertigen, sondern ganz besonders für die Unterstützung in dieser Zeit, für viele konstruktive Gespräche und das wunderbare Arbeitsklima.

Herr Prof. Dr. Lars Matthias Voll danke ich für die Zweitkorrektur meiner Arbeit. Prof. Dr. Lars-Oliver Essen und Prof. Dr. Uwe Maier danke ich für den Beitrag zur Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach und besonders Dr. Stefan Baumeister, Mareike Lorenz und Nadja Braun möchte ich außerdem für die Unterstützung bei der Untersuchung des Chloroplastenproteoms und den CoIPs danken. Dr. Uwe Linne danke ich für die LC-ESI-MS/MS Analysen.

Ein großer Dank gilt allen Mitgliedern der AG Batschauer für zahlreiche Hilfestellungen und Unterstützung in allen Lebenslagen. Dabei danke ich Elvira Happel und Jeanette Schermuly für die Klonierungen und Übernahme anderer molekularbiologischer Arbeiten. Bei Agnes Damm bedanke ich mich für die Unterstützung mit meinen Pflanzen und den morgendlichen Kaffee. Dr. Richard Pokorny, Dr. Gebhard Kaiser, Dr. Christian Michalski, Dr. Elzbieta Charkiewicz, Katja Brangs und Christian Orth danke ich für die vielen, guten Diskussionen und fachliche sowie methodische Unterstützung, aber auch und ganz besonders für eine unvergessliche Zeit.

Ein großer Dank geht an die Studenten Felix Hamann, Heval Atas und Alexander Schabasian für die Untersuchungen zur Genexpression und an Maribel Dionisio-Sese für die Hypokotyllängenmessungen.

Ich danke Katja Brangs und Danny Edel für die Korrektur dieser Arbeit.

Abschließend gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie. Danke dass ihr mich immer unterstützt und für mich da seid.

Lebenslauf

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation:

„Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana* - Kofaktoren, Lokalisation und Funktion in planta“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Des Weiteren versichere ich, dass ich abgesehen von dieser Dissertation noch keine weiteren Dissertationen angefertigt oder dies versucht habe.

Marburg, _____